

ANNALES DE L'INSTITUT PASTEUR

ÉTUDES SUR LA FLORE INTESTINALE

(TROISIÈME MÉMOIRE)

par ÉL. METCHNIKOFF.

TOXICITÉ DES SULFOCONJUGUÉS DE LA SÉRIE AROMATIQUE

Depuis quelque temps, les notions sur l'auto-intoxication par les poisons d'origine intestinale, notions qui autrefois étaient encore très vagues, commencent à se préciser. Bien qu'il ne manque pas de savants pour défendre la thèse d'une symbiose entre l'organisme et les microbes qui pullulent dans nos intestins, il est généralement admis qu'un certain nombre d'entre eux, capables de provoquer des lésions importantes, constituent un danger pour l'organisme. Le coli-bacille, le microbe le plus répandu du tube digestif, est un producteur actif d'une toxine très dangereuse. D'après les recherches de Stoudzinski (1), faites dans notre service, les cultures de ce microbe, tuées par la chaleur, sont capables d'amener la mort de cobayes par injection intraveineuse. Filtrées à travers la bougie Chamberland, les cultures en bouillon du coli-bacille après des injections répétées dans le péritoine provoquent chez le cobaye des lésions aortiques. Le fait que ce microbe passe parfois dans la circulation pour amener des troubles plus ou moins graves de l'organisme est suffisamment établi.

(1) *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, 1911, p. 225.

Un des anaérobies les plus constants dans le tube digestif de l'homme, le *Bacillus Welchii* (bacille des phlegmons gazeux ou *B. perfringens*), produit, dans certaines conditions de développement, une toxine mortelle pour les animaux de laboratoire. Deux autres anaérobies putréfians, fréquents dans la flore intestinale, le *Bacillus sporogenes* et le *Bacillus putrificus*, sont également capables de produire des toxines dangereuses (1). Parmi les bactéries putréfactives anaérobies facultatives, c'est le *Bacillus proteus* ou *Proteus vulgaris* de Hauser qui, sans être un hôte constant de l'homme, se rencontre souvent dans son tube digestif. D'après les recherches de Cantu (2), sur 50 échantillons de matières fécales de sujets bien portants, il a été trouvé dans 15, c'est-à-dire dans 30 p. 100 des cas. Or, ce bacille est toxique, ainsi qu'il a été démontré depuis déjà assez longtemps. Tout récemment, Albert Berthelot (3) a établi que c'est dans un milieu renfermant de la peptone de caséine que le *Proteus* donne le plus de substances toxiques, parmi lesquelles prédomine de beaucoup une toxine proprement dite.

Moins fréquents parmi les bactéries protéolytiques de la flore humaine sont les staphylocoques. Tandis qu'en Allemagne Moro a rencontré le staphylocoque blanc dans presque toutes les selles d'enfants nourris au sein, Tissier (4) et Schiller (5) ne l'ont trouvé à Paris que très rarement chez le nourrisson. Chez l'homme adulte normal, le dernier observateur l'a isolé deux fois sur douze cas examinés.

Bien plus fréquentes sont les espèces protéolytiques facultatives mentionnées dans le tube digestif de certains animaux. Ainsi le *Proteus* est l'hôte constant de la flore intestinale du rat. Il se rencontre très fréquemment dans celle du cheval (6), des bovidés et des moutons (7). Quant aux staphylocoques, ils sont presque constants dans le contenu intestinal de rats,

(1) METCHNIKOFF, ces *Annales*, 1908, p. 951.

(2) Ces *Annales*, 1911, p. 852.

(3) Recherches sur quelques caractères du *Proteus vulgaris*, Thèse de Médecine, Paris, 1913.

(4) *Recherches sur la flore intestinale du nourrisson*. Paris, 1900, p. 141.

(5) Ces *Annales*, 1913, p. 69.

(6) GIOUKEWITCH, *Annales de l'Institut Pasteur*, 1911, p. 255.

(7) CHOUKEWITCH, ces *Annales*, 1913, p. 307.

de lapins et de chiens alimentés de viande et de pain (Schiller, *loc. cit.*, p. 74).

Les staphylocoques sont réputés comme producteurs de poisons, parmi lesquels on connaît surtout la leucocydine de Van de Velde, toxine active contre les globules blancs, et l'hémolysine, destructrice des globules rouges (Neisser et Wechsberg). Le poison des staphylocoques est particulièrement remarquable par son pouvoir de provoquer des lésions artérielles, ainsi que l'ont établi Saltykow (1) et Manouélian (2).

On voit d'après ces exemples, qui sont cependant loin d'épuiser la question, que la flore intestinale renferme parmi ses hôtes constants ou fréquents plusieurs espèces éminemment toxiques. Il était donc bien légitime de se demander si leurs poisons ne jouent pas quelque rôle dans les auto-intoxications de l'organisme d'origine intestinale. Or, il se trouve que précisément certaines toxines bactériennes se distinguent par l'inaptitude à traverser la paroi intestinale et à se répandre dans l'organisme. Ainsi Soudzinsky a établi que les poisons de colibacilles « introduits par la voie buccale ne produisent pas de lésions particulières dans l'organisme de l'animal » (*loc. cit.*, p. 226). De même les toxines des staphylocoques, si actives lorsqu'on les introduit directement dans la circulation, se sont montrées impuissantes pour amener l'artériosclérose par la voie des organes digestifs.

Il existe toute une littérature sur le sort de plusieurs toxines bactériennes, surtout des toxines tétanique et diphtérique, introduites dans les intestins. Le résultat général de ces recherches est que ces poisons sont incapables d'exercer leur action funeste dans ces conditions. On attribue aux sucs digestifs le pouvoir de détruire les toxines bactériennes. Ce sont surtout le suc gastrique, le suc pancréatique et en partie la bile qui exercent cette fonction.

D'après Nencky, Sieber et Schumow (3) le mélange de suc pancréatique avec la bile agit beaucoup plus énergiquement que chacun de ces sucs isolément. La plupart des toxines bactériennes étudiées ne sont pas résorbées par la paroi des intes-

(1) *Beiträge z. pathol. Anatomie*, 1908, p. 147.

(2) *Ces Annales*, 1913, p. 12.

(3) *Centralbl. f. Bakteriologie*, 1898, vol. XXIII, p. 840.

tins et certains parmi ces poisons sont affaiblis ou détruits par les microbes intestinaux. Récemment, Lesné et Dreyfus (1) ont fait à ce sujet des expériences qui les ont amenés à conclure que les poisons intestinaux ne peuvent être accusés d'auto-intoxication intestinale. Il est cependant impossible d'accepter cette opinion comme règle générale, car il existe bien des poisons bactériens qui exercent toute leur action à travers le tube digestif; comme exemple classique nous pouvons citer le poison du bacille du botulisme, si bien étudié par van Ermenghem (2).

Tandis que d'un côté on a insisté sur l'impossibilité, pour les produits toxiques des bactéries intestinales, d'amener des troubles de l'organisme par la voie des organes digestifs, on a fait valoir, de l'autre côté, que les produits bactériens, développés dans le contenu intestinal et capables de pénétrer dans la circulation, sont dépourvus d'action toxique. Parmi ces produits, les substances de la série aromatique (ou cyclique) occupent la première place.

Après une période d'hésitation, il est actuellement admis d'une façon générale que les phénols et l'indol, dont les dérivés se retrouvent dans l'urine, sont le produit des microbes intestinaux, parmi lesquels le coli-bacille et certaines bactéries anaérobies jouent le rôle prépondérant. On ne nie pas l'action toxique des phénols, mais on pense que ces substances, une fois qu'elles ont pénétré dans la circulation, se transforment en conjugués sulfuriques et glycuroniques, dépourvus de toute toxicité. Quant à l'indol, on le considère soit comme tout à fait inoffensif, soit comme ne possédant qu'un pouvoir toxique très limité. Conjugué dans l'organisme avec les acides sulfurique et glycuronique, l'indol perdrait toute son action.

Dans ces derniers temps, cette question a été étudiée dans mon laboratoire. Dratchinsky (3) a établi que l'indol est capable d'amener une intoxication aiguë et mortelle par injection sous-cutanée et intrapéritonéale ou par introduction buccale. La dose mortelle par 100 grammes varie entre 0,038 et 0,16 dans le premier cas et est égale à 0,38 par la voie stomacale. L'administration par la bouche de petites doses d'indol, répétées pen-

(1) *Clinique*, 2 mai 1913.

(2) *Archives de Pharmacodynamie*, vol. III, 1897.

(3) *Ces Annales*, 1912, p. 401.

dant plusieurs mois, a amené chez les animaux de laboratoire (cobayes et singes) des lésions chroniques se résumant en phénomènes de sclérose. Ce résultat a été confirmé par Wladyczko (1) pour ce qui concerne le cerveau.

Etant donné que l'indol, introduit par la bouche, se transforme en partie dans l'organisme en indoxylsulfate de potassium, il faut conclure des expériences que nous venons de mentionner que cette substance est un poison capable de provoquer des lésions chroniques d'une grande importance. Mais, pour arriver à une notion plus précise sur son action toxique, il a été intéressant d'établir si elle pouvait amener l'empoisonnement aigu de l'organisme. Grâce au bienveillant concours de la maison Hoffmann-La Roche, à laquelle nous adressons nos plus vifs remerciements, nous avons pu nous procurer à deux reprises 3 grammes d'indoxylsulfate de potassium. Admettant comme probable la faible toxicité de ce produit, nous n'avons pu l'étudier que sur de petits mammifères, tel que souris, jeunes cobayes et jeunes lapins. Etant donnée la grande solubilité de la substance dans l'eau, nous en injections une solution de 1 gramme dans 16 cent. cubes d'eau (1 cent. cube de la solution contenant 0,0625 d'indoxylsulfate de potassium). La dose minimale mortelle pour une souris adulte (18-20 gr.) est de 0,0625 par injection dans le péritoine ou sous la peau. Aussitôt après l'introduction du poison, les souris accusent des mouvements convulsifs du diaphragme; les convulsions des membres ne tardent pas à se manifester et la mort survient dix à vingt minutes après l'injection toxique. Lorsque celle-ci est faite dans le péritoine, il s'accumule dans cette cavité une sérosité transparente renfermant quelques cellules mononucléaires. Après l'injection sous-cutanée, il ne se produit pas de transsudation locale. A l'autopsie, tous les organes se présentent à l'état normal, sauf les intestins, fortement hypérémisés chez les souris qui ont reçu le poison dans le péritoine. Lorsque la mort n'arrive pas bientôt après l'injection (ce qui s'observe avec des doses inférieures à la minimale mortelle), les souris ne manifestent aucun symptôme tant soit peu marqué.

D'après les quelques expériences faites sur des jeunes cobayes,

(1) *Ibid.*, 1913, p. 336.

leur sensibilité pour l'indoxylsulfate de potassium est à peu près la même que celle des souris, plutôt même un peu plus grande. La dose de 0,125 est la dose minimale mortelle en injection intrapéritonéale. Elle provoque d'abord des mouvements spasmodiques des muscles abdominaux, suivis par des convulsions du train de derrière. La mort survient dans la première demi-heure après l'injection. L'autopsie révèle l'hyperémie des organes abdominaux et l'accumulation d'une sérosité transparente dans le péritoine. Le cœur s'arrête en diastole. Chez les lapins, même chez des jeunes de 250-600 grammes, étant donnée la petite quantité de la substance que nous avons pu employer, nous n'avons pu obtenir que des phénomènes passagers de parésie des pattes postérieures. (V. Appendice I.)

Pour juger du degré d'atténuation de la toxicité de l'indol par sa transformation en indoxylsulfate de potassium, il a fallu faire des expériences comparatives avec le premier. Vu sa très faible solubilité dans l'eau, nous l'avons administré à nos animaux en solution dans l'huile d'olive.

La dose minimale mortelle pour la souris est de 0,0125 gr., c'est-à-dire cinq fois plus faible que la dose correspondante d'indoxylsulfate de potassium. A peu près le même rapport a été constaté pour les petits cobayes qui meurent à partir de 0,02 grammes d'indol injecté sous la peau. (V. Appendice II.) D'après Dratchinsky (*loc. cit.*, p. 407), la dose minimale mortelle pour 100 grammes de cobaye serait de 0,038, chiffre qui n'est pas trop différent du mien.

Ainsi que nous l'avons mentionné ailleurs (1), le paracrésylsulfate de potassium, dérivant du paracrésol, cet autre produit des bactéries intestinales, est également un poison actif. Cette substance, que nous devons aussi à l'obligeance de la maison Hoffmann-La Roche, et dont nous avons eu à notre disposition une plus grande quantité que d'indoxylsulfate de potassium, a pu être étudiée sur un plus grand nombre d'animaux. La dose minimale mortelle pour la souris, de 0,05 gr., s'est montrée à peine plus élevée que celle de l'indoxylsulfate de potassium. 1 gramme de paracrésylsulfate de potassium, injecté sous la peau d'un rat adulte, a amené la mort en une

(1) Ces *Annales*, 1912, p. 827.

deux heures. Des cobayes de 300 à 320 grammes meurent une heure et demie après l'administration de la même dose dans le péritoine. Les lapins sont encore plus sensibles au paracrésylsulfate de potassium. (V. Appendice III.)

L'atténuation que l'organisme est capable de faire subir au paracrésol est comparable à celle que nous avons constatée pour l'indol. Ainsi, pour la souris, le paracrésol est cinq fois plus toxique que le paracrésylsulfate de potassium. (V. Appendice IV.)

Étant donné que dans un mémoire antérieur (1) nous avons déjà exposé certains renseignements sur la toxicité du phénylsulfate de potassium, nous pouvons nous borner ici à quelques remarques. La dose minimale mortelle de ce sel pour la souris est voisine de celle des deux autres sulfoconjugués que nous avons étudiés, car elle s'est montrée égale à 0,07 gramme par injection sous-cutanée. Pour le rat adulte, elle a été de 0,57. (V. Appendice V.)

Il résulte de nos recherches que les trois principaux sulfoconjugués produits aux dépens des corps aromatiques d'origine bactérienne, en dehors de leur pouvoir d'amener des lésions chroniques de l'organisme, sont encore capables de provoquer la mort rapide par intoxication aiguë. L'organisme des mammifères, bien qu'en état de réduire au cinquième la toxicité de l'indol et des phénols, n'est point capable de les rendre inoffensifs, comme on le pense couramment. Ce fait apporte une nouvelle justification des moyens que l'on a proposés pour éviter la formation des poisons de la série aromatique par les microbes de notre flore intestinale : un régime approprié, ainsi que l'emploi des bactéries antagonistes des microbes producteurs de ces poisons (2).

(1) Ces *Annales*, 1910, p. 759.

(2) Je saisis cette occasion pour signaler une erreur dans laquelle est tombé le Dr Baar (*Die Indicanurie*, Berlin, Wien, 1912) au sujet de l'emploi des ferments lactiques. Au lieu de se servir, dans ses essais de traitement de l'indicanurie, de préparations convenables, bien contrôlées au point de vue de leur richesse en microbes lactiques actifs, il n'employait que des produits desséchés, qui très souvent ne contiennent que des ferments morts. L'inobservance de cette règle élémentaire a été certainement la source principale de l'insuccès du Dr Baar.

APPENDICE I

Expériences avec l'indoxylsulfate de potassium.

Exp. 1.	1 ^{er} mars 1913.	Petit lap. de 370 gr.	0,1250 gr. dans le péritoine.	Guéri.	Paralysie passagère du train de derrière.
Exp. 2.	»	Petit lap. de 580 gr.	0,50 gr. dans le péritoine,	Guéri.	
Exp. 3.	3 mars 1913.	Souris de 22,50 gr.	0,08 gr. dans le péritoine.	Mort en 19 minutes.	Aussitôt après l'injection, contracture des muscles abdominaux. Convulsions, mort. A l'autopsie 1 c. c. de sérosité transparente avec quelques mononucléaires. Grosse rate. Hypémie des intestins. Poumons, foie, reins, capsules surrénales normaux.
Exp. 4.	»	Souris de 20 gr.	0,06 gr. sous la peau.	Mort en 24 minutes.	Pas d'exsudat sur la peau. Organes d'apparence normale.
Exp. 5.	»	Souris de 21 gr.	0,08 gr. dans le péritoine.	Mort en 22 minutes.	Les mêmes symptômes et le même résultat d'autopsie que la souris de l'expérience 3.
Exp. 6.	»	Souris de 18 gr.	1 c. c. de la sérosité péritonéale de la souris de l'exp. 3.	Rien d'anormal.	
Exp. 7.	»	Souris de 21 gr.	1 c. c. de la toxicité péritonéale de la souris de l'exp. 5.	Rien d'anormal.	
Exp. 8.	»	Souris de 19 gr.	0,0312 gr. sous la peau du dos.	Rien d'anormal.	
Exp. 9.	8 avril 1913.	Cobaye de 59 gr.	0,1230 gr. dans le péritoine.	Mort en 23 minutes.	Aussitôt après l'injection, mouvements convulsifs des muscles abdominaux; convulsions des pattes postérieures. Collapsus. Mort.
Exp. 10.	»	Souris de 20 gr.	0,1230 gr. dans le péritoine.	Mort en 12 minutes.	Convulsions.

Exp. 11.	14 sept. 1913.	Souris de 23 gr.	0,0312 gr. dans le péritoine.	Rien d'anormal.	
Exp. 12.	»	Souris de 23 gr.	0,0312 gr. sous la peau.	Rien d'anormal.	
Exp. 13.	»	Souris de 21 gr.	0,0625 gr. sous la peau.	Mort en 28 minutes.	Contracture des muscles abdominaux. Convulsions. Mort. Cœur en diastole. Organ. int. normaux.
Exp. 14.	14 sept. 1913.	Souris de 18 gr.	0,0625 gr. dans le péritoine.	Mort en 19 minutes.	Autopsie : sérosité transparente dans la cavité péritonéale. Reins hyperémiés. Capsules surrénales normales. Quelques petits nodules blancs dans le foie.
Exp. 15.	»	Souris de 18 gr.	0,1250 gr. dans le péritoine.	Mort en 13 minutes.	Aussitôt après l'injection, mouvements respiratoires convulsifs. A l'autopsie : poumons, reins, capsules surrénales normaux, intestins hyperémiés. Dans le foie, un petit nodule blanc. Sérosité abondante dans la cavité péritonéale.
Exp. 16.	»	Lapin de 245 gr.	0,1875 gr. dans le péritoine.	Guéri.	Parésie passagère du train postérieur.
Exp. 17.	»	Lapin de 280 gr.	0,3125 gr. dans le péritoine.	Guéri.	Parésie passagère du train postérieur.

APPENDICE II

Expériences avec l'indol.

Exp. 1.	9 avril 1913.	Souris de 20 gr.	0,01 gr. sous la peau.	Rien d'anormal.	
Exp. 2.	»	Souris de 20 gr.	0,006 gr. sous la peau	Pas d'accidents d'intoxica- tion indol.	Trouvée morte le lendemain avec rate très grosse.

Exp. 3.	14 avril 1913	Souris de 16 gr.	0,0125 gr. sous la peau.	Aussitôt apr. l'inj. tremblem. du corps. Mort dans 10 heures.	
Exp. 4.	»	Souris de 16 gr.	0,00125 gr. dans le péritoine.	Rien d'anormal.	
Exp. 5.	»	Souris de 14 gr.	0,00125 gr. sous la peau.	Rien d'anormal.	
Exp. 6.	9 avril 1913.	Cobaye de 210 gr.	0,2 gr. dans le péritoine.	Mort en 15 minutes.	10 minutes après l'injection, convulsions générales. A l'au- topsie : un peu d'huile dans le péritoine. Cœur en diastole, rem- pli de sang foncé, liquide. Or- ganes d'apparence normale.
Exp. 7.	9 avril 1913.	Cobaye de 175 gr.	0,5 c.c. sous la peau.	Mort en 2 heures.	Une demi-heure après l'injec- tion, mouvements convulsifs du tronc. Pattes paralysées. A l'au- topsie, les organes ont l'appa- rence normale.
Exp. 8.	14 avril 1913.	Cobaye de 95 gr.	0,0125 gr. dans le péritoine.	Mort après 4 jours.	10 minutes après l'injection ont commencé les convulsions géné- rales. Le cobaye reste couché pendant quelque temps.
Exp. 9.	«	Cobaye de 95 gr.	0,025 gr. dans le péritoine.	Mort en 10 heures.	12 minutes après l'injection trem- blement général. 9 minutes après convulsions. Collapsus.
Exp. 10.	»	Cobaye de 100 gr.	0,0025 gr. sous la peau.	Aucun signe d'in- toxication. Mort 4 jours ap. l'injection.	

APPENDICE III

Expérience avec le paracrésylsulfate de potassium.

Exp. 1.	9 janv. 1912.	Lapin de 550 gr.	1 gr. dans le péritoine.	Mort en 35 minutes.	Dans le péritoine, sérosité rose. Capsules surrén., hyperémies. Autres organes normaux.
------------	---------------------	------------------------	--------------------------------	---------------------------	---

Exp. 2.	9 janv. 1912,	Lapin de 550 gr.	2 gr. dans le péritoine.	Mort en 25 minutes.	Aussitôt après l'injection, convulsions des pattes passagères. Après un certain temps d'arrêt, reprises de convulsions jusqu'à la mort.
Exp. 3.	"	Cob. de 320 gr.	1 gr. dans le péritoine.	Mort en 1 heure et demie.	
Exp. 4.	"	Cob. de 300 gr.	1 gr. dans le péritoine.	Mort en 1 heure et demie.	
Exp. 5.	"	Rat adulte.	1 gr. sous la peau.	Mort en 30 minutes.	
Exp. 6.	"	Rat adulte.	0,5 gr. sous la peau.	Mort le lendemain.	
Exp. 7.	"	Rat adulte.	0,2 gr. sous la peau.	Mort en 84 heures.	
Exp. 8.	"	Souris adulte.	0,3 gr. sous la peau.	Mort en 11 minutes.	
Exp. 9.	"	Souris adulte.	0,4 gr. sous la peau.	Mort en 12 minutes.	
Exp. 10.	"	Souris adulte.	0,05 gr. sous la peau.	Mort en 30 minutes.	
Exp. 11.	"	Souris adulte.	0,025 gr. sous la peau.	Mort en 90 heures.	
Exp. 12.	"	Souris adulte.	0,025 gr. sous la peau.	Rien d'anormal.	

APPENDICE IV

Expériences avec le paracrésol.

Exp. 1.	19 janv. 1912.	Lapin de 1200 gr.	0,1 gr. dans le péritoine.	Mort en 12 heures.	Cinq minutes après l'injection, convulsions des pattes postérieures.
Exp. 2.	»	Lapin de 600 gr.	0,05 gr. dans le péritoine.	Mort en 12 heures.	
Exp. 3.	»	Lapin de 620 gr.	0,002 gr. dans le péritoine.	Rien d'anormal.	
Exp. 4.	»	Cob. de 370 gr.	0,002 gr. dans le péritoine.	Rien d'anormal.	
Exp. 5.	»	Cob. de 450 gr.	0,08 gr. dans le péritoine.	Guéri.	
Exp. 6.	»	Rat de 83 gr.	0,1 gr. sous la peau.	Mort en 90 minutes.	Aussitôt l'injection, après convulsions générales.
Exp. 7.	»	Rat de 94 gr.	0,08 gr. sous la peau.	Mort en plus de 2 heures.	
Exp. 8.	»	Rat de 83 gr.	0,02 gr. sous la peau.	Mort en 90 heures.	Bientôt après l'injection, convulsions générales passagères.
Exp. 9.	»	Rat adulte.	0,005 gr. sous la peau.	Mort en 90 heures.	
Exp. 10.	30 janv. 1912.	Lapin de 480 gr.	0,2 gr. sous la peau du dos.	Mort en 60 heures.	A l'autopsie : congestion pulmonaire bilatérale.
Exp. 11.	»	Lapin de 670 gr.	0,02 gr. dans le péritoine.	Mort en 36 heures.	

Exp. 12.	30 janv. 1913.	Lapin de 570 gr.	0,01 gr. dans le péritoine.	Rien d'anormal.	
Exp. 13.	»	Lapin de 520 gr.	0,005 gr. dans le péritoine.	Rien d'anormal.	
Exp. 14.	»	Souris adulte.	0,02 gr. sous la peau.	Mort en 2 heures et 5 min.	Bientôt après l'injection, con- vulsions générales.
Exp. 15.	»	Souris adulte.	0,01 gr. sous la peau.	Mort en 3 heures.	Idem.
Exp. 16.	»	Souris adulte.	0,005 gr. sous la peau.	Rien d'anormal.	
Exp. 17.	»	Souris adulte.	0,0025 gr. sous la peau.	Idem.	
Exp. 18.	»	Souris adulte.	0,00125 gr. sous la peau.		

APPENDICE V

Expériences avec le phénylsulfate de potassium.

Exp. 1.	18 janv. 1910.	Lapin de 240 gr.	2 gr. 30 sous la peau.	Rien d'anormal.	
Exp. 2.	»	Cob. de 570 gr.	1 gr. 45 sous la peau.	Mort en 12 heures.	
Exp. 3.	»	Cob. de 550 gr.	0,57 gr. sous la peau.	Mort en 12 heures.	
Exp. 4.	»	Souris de 17 gr.	0,28 gr. sous la peau.	Mort en 5 minutes.	

Exp. 5.	18 janv. 1910.	Souris de 15 gr.	0,14 gr. sous la peau.	Mort en 10 minutes.	
Exp. 6.	"	Souris adulte.	0,11 gr. sous la peau.	Mort en 75 minutes.	
Exp. 7.	"	Souris de 14 gr.	0,07 gr. sous la peau.	Mort en 10 minutes.	
Exp. 8.	"	Rat de 160 gr.	1,15 gr. sous la peau.	Mort en quelques heures.	
Exp. 9.	"	Rat adulte.	0,57 gr. sous la peau.	Mort en 36 heures.	
Exp. 10.	"	Rat de 200 gr.	0,28 gr. sous la peau.	Rien d'anormal.	
Exp. 11.	27 janv. 1910	Souris de 16 gr.	0,28 gr. sous la peau.	Mort aussitôt apr. l'inj.	
Exp. 12.	"	Souris de 13 gr.	0,14 gr. sous la peau.	Mort en 20 minutes.	
Exp. 13.	"	Souris de 13 gr.	0,07 gr. sous la peau.	Mort en peu de minutes.	
Exp. 14.	"	Souris adulte.	0,035 gr. sous la peau.	Guérie ap. maladie passagère.	
Exp. 15.	"	Souris adulte.	0,017 gr. sous la peau.	Rien d'anormal.	

LE DIAGNOSTIC DE LA RAGE

PAR LA DÉMONSTRATION DU PARASITE SPÉCIFIQUE

RÉSULTATS DE DIX ANS D'EXPÉRIENCES

par M^{me} le D^r LINA NEGRI LUZZANI.

(Travail du laboratoire de M. le prof. Golgi, de l'Université de Pavie.)

PREMIÈRE PARTIE

C'est au D^r Negri que revient le mérite d'avoir démontré (1903) que dans le système nerveux des animaux atteints d'hydrophobie, et uniquement dans le système nerveux de ces animaux, on peut mettre en évidence des formations endocellulaires particulières; il interpréta ces formations comme des stades évolutifs d'un microorganisme à ranger parmi les protozoaires.

Le parasite, dans ses stades connus jusqu'ici, réside à l'intérieur des cellules nerveuses. Toutes les cellules de toutes les régions de l'axe cérébro-spinal peuvent être envahies par le parasite (les cellules de la corne d'Ammon, de l'écorce cérébrale, du cervelet, du pont, de la moelle allongée, de la moelle épinière, des ganglions spinaux).

Sa distribution dans les différentes régions du système nerveux est en rapport avec la voie d'entrée du virus rabique dans l'organisme et avec le tableau clinique de la maladie; sa présence, cependant, étant donnée une durée convenable de la période d'incubation, est un fait constant; le parasite se rencontre chez tous les animaux qui ont contracté la maladie naturellement et chez ceux sur lesquels on l'a expérimentalement provoquée (chien, chat, lapin, cobaye, bœuf, chèvre, mouton, cochon, âne, cheval, oiseaux, homme).

Dans la rage furieuse (telle que l'on peut la provoquer par injection intracérébrale, intra-oculaire, scarifications cornéales et conjonctivales, par dépôt de virus rabique au niveau des

muqueuses labiale et nasale, par injection dans le nerf médian), le parasite réside principalement dans les cellules de la corne d'Ammon, du cervelet, de l'écorce cérébrale: Dans la rage paralytique, au contraire (telle que l'on peut la provoquer par l'injection du virus rabique dans le nerf sciatique), les parasites sont rares ou manquent complètement dans ces régions, tandis qu'on rencontre des formes typiques et, dans quelques cas, abondantes, dans les ganglions spinaux et dans la moelle épinière.

L'apparition des formes parasitaires dans le système nerveux coïncide avec celle des premiers symptômes de la maladie. Pour pouvoir mettre en évidence le parasite spécifique, il est donc nécessaire que la période d'incubation soit d'une certaine durée; expérimentalement, Negri a déterminé qu'elle doit être d'environ 14 à 15 jours chez le lapin, 12 à 13 jours chez le chien.

Chez les animaux morts à la suite de l'inoculation de virus fixe, les parasites sont très petits et peu nombreux; la démonstration en est difficile; on comprend dès lors facilement pourquoi leur présence a pu échapper à quelques observateurs.

Chez les animaux qui ont présenté le tableau clinique de la rage furieuse, le siège de prédilection du microorganisme est la corne d'Ammon; il y paraît plus tôt et avec des formes plus développées que dans les autres parties du système nerveux.

Conformément à la propriété du système nerveux des animaux enragés, de conserver (dans certaines limites de temps) la virulence inaltérée malgré la putréfaction avancée, et de la maintenir telle dans la glycérine, le microorganisme décrit par Negri conserve, lui aussi, ses propriétés caractéristiques malgré la putréfaction et malgré l'immersion prolongée dans la glycérine.

Le parasite est spécifique; Negri et les auteurs qui ont institué des recherches de contrôle, n'ont jamais rencontré de formations semblables dans les cellules nerveuses d'animaux normaux et d'animaux affectés d'autres maladies.

Le parasite de la rage présente des formes et des dimensions variables; de stades jeunes à dimensions très petites on passe à des stades plus développés et de dimensions plus considérables. Quelles que soient ces dimensions, à l'intérieur du parasite on

observe toujours des modifications structurales caractéristiques, pouvant s'interpréter comme des stades d'un cycle de développement.

En ayant recours aux plus fines méthodes employées pour l'étude des protozoaires, Negri a démontré qu'à l'intérieur du parasite il existe en effet de petits blocs et des granules d'une substance ayant toutes les réactions de la chromatine; c'est-à-dire que le parasite est toujours constitué de deux parties essentielles, substance fondamentale et chromatine ainsi qu'on l'observe chez d'autres protozoaires. C'est dans la chromatine que se produisent les modifications auxquelles sont subordonnés les divers stades du cycle évolutif.

Le noyau du parasite est d'abord unique. A mesure que les diamètres du parasite augmentent, le noyau croît à son tour, se fragmente en petits amas qui se dispersent uniformément dans le corps du protozoaire. Lorsque interviennent les facteurs inconnus qui amènent le parasite à la sporulation, — quelle que soit la grandeur que le parasite ait atteinte, — la chromatine qui, en partie, s'est distribuée en petits blocs, correspondant à chacun des amas de la substance nucléaire plus claire, est soumise à des processus de division qui se développent et se répètent suivant des lois déterminées, jusqu'à ce qu'elle soit totalement réduite en petits granules de grosseur uniforme. Lorsque la division de toute ou de presque toute la chromatine sous forme de granules très fins et uniformes s'est accomplie, le protoplasma se subdivise autour de chacun de ces granules; c'est-à-dire que le microorganisme se transforme en un amas de corps très petits, « spores », constitués par un granule de chromatine entouré d'une capsule ou involucre bien individualisé de protoplasma. Les spores sont d'abord réunies dans une masse unique compacte; leurs rapports réciproques deviennent ensuite moins étroits et, dans des conditions déterminées, elles peuvent s'éloigner les unes des autres et s'élever à la dignité d'un nouvel être.

En résumé : les « corps de la rage » sont des éléments qui ont des caractères et une structure constante; ils croissent à l'intérieur de la cellule nerveuse et, à la suite de modifications intimes, suivant des lois déterminées et constantes, ils présentent un processus de division qui aboutit à la transforma-

tion du « corps » primitif en un nombre considérable d'éléments fils, « spores » : le mécanisme de production des spores ne diffère pas non plus de ce qu'on observe dans d'autres protozoaires. Les spores ont des dimensions minimales; elles possèdent la structure du parasite originaire et elles peuvent devenir des êtres libres.

Je ne désire pas rapporter ici tous les arguments qui parlent en faveur de la nature protozoaire des « corps de Negri » et les arguments qui furent apportés contre cette interprétation. Je rappellerai seulement que, à l'interprétation de Negri, plusieurs autres observateurs se sont associés. Nombre d'autres auteurs admettent la nature parasitaire des corps de Negri, tout en s'éloignant de lui à propos de la position du parasite dans la systématique: Negri pensait qu'il s'agissait d'un sporozoaire: ces auteurs pensent qu'il s'agit d'un chlamydozoaire.

Tous les auteurs cependant s'accordent pour reconnaître que les « corps de Negri » — qu'ils représentent tout le parasite, ou une réaction de la cellule nerveuse vis-à-vis du parasite contenu dans leur intérieur, ou une réaction de la cellule nerveuse contre le virus rabique — constituent une donnée typique et exclusive de l'infection rabique. De cette constatation, sur laquelle personne, parmi ceux qui se sont sérieusement occupés de la question, n'ose plus soulever aucun doute, on tire logiquement la déduction d'appliquer la recherche des « corps de Negri » au diagnostic de la rage.

Je ne m'arrêterai point à démontrer quel intérêt il y a à pouvoir établir avec certitude, le plus rapidement possible, le diagnostic de l'infection rabique, spécialement chez les animaux qui mordent l'homme. Avec les autres méthodes en usage, le diagnostic ne peut être établi avec certitude qu'après un temps très long.

Dès sa première communication, Negri lui-même faisait remarquer l'importance de l'application pratique de sa découverte, et il la démontrait au moyen d'un premier groupe d'observations. Quelques mois plus tard, il revenait sur la même question, et il rapportait alors une série de recherches sur 88 animaux suspects, chez lesquels le résultat de l'épreuve microscopique avec la démonstration du parasite avait été

pleinement confirmé par le résultat de l'épreuve expérimentale.

En peu de temps la nouvelle méthode diagnostique a été adoptée avec un succès toujours croissant dans une nombreuse série d'Instituts antirabiques du monde entier. Les nombreuses statistiques publiées dans l'espace des neuf dernières années et les informations particulières de directeurs d'Instituts antirabiques sont toutes unanimes pour confirmer l'utilité et les avantages de la nouvelle méthode diagnostique. Un fait me paraît très significatif et de la plus haute importance; c'est que pas un des observateurs qui l'ont employée ne l'a abandonnée, après en avoir fait une sérieuse et suffisante expérience.

Je vais mentionner seulement les plus importantes parmi les communications et les statistiques publiées par les différents Instituts antirabiques et scientifiques.

VOLPINO, de l'Institut d'Hygiène de l'Université de Turin (84), sur 37 cas examinés, rencontre dans 31 les « corps de Negri » dans la corne d'Ammon; il pose le diagnostic de rage, qui est confirmé par l'épreuve biologique avec les inoculations aux animaux; l'épreuve biologique fait exclure l'infection rabique pour les autres, chez lesquels la recherche des « corps de Negri » avait été négative.

DADDI, de l'Institut antirabique de Florence (19), publia en 1904 les résultats de 134 observations; démonstration du parasite et épreuve biologique positive dans 77 cas; négative toutes les deux dans 55 cas; chez deux animaux seulement la démonstration du parasite fut négative, tandis que l'épreuve expérimentale donna un résultat positif.

D'AMATO, à l'Institut antirabique de Naples (20, 21), sur 32 cas rencontre le parasite dans 28 : résultat négatif dans les autres. L'épreuve expérimentale confirma dans tous les cas le résultat de l'examen microscopique.

Moi-même, en 1904 (44), je publiai les observations de 177 cas; la recherche du parasite m'avait donné un résultat positif dans 101, négatif dans 71; tous ces résultats furent confirmés par l'épreuve expérimentale; au contraire, dans 5 cas, l'inoculation aux animaux démontra la rage, tandis que la recherche du parasite avait donné un résultat négatif.

ABBA et BORMANS, en 1905, recueillirent 93 observations poursuivies à l'Institut antirabique de Turin (1); démonstration positive des « corps de Negri » dans 58 cas, négative dans 35. Tous les résultats furent confirmés par les inoculations aux animaux.

Une correspondance parfaite entre les résultats des deux épreuves (microscopique et biologique) est obtenue aussi par BASCHIERI (5) de l'Institut antirabique de Faenza, dans 30 cas, dont 25 positifs, 5 négatifs.

WILLIAMS et LOWDEN, au Research Laboratory Department Health à New-York, sur 37 cas, dont 29 positifs, 8 négatifs, obtinrent toujours les résultats de l'épreuve microscopique confirmés par l'épreuve expérimentale (85).

S. von RATZ, à l'Institut de pathologie de l'École vétérinaire supérieure de Budapest (71) a examiné en quatre années, avec un résultat positif, 258 cas, c'est-à-dire qu'on complétait dans chaque cas l'examen microscopique par les inoculations expérimentales pour contrôler le résultat de l'examen histologique. Les animaux inoculés périssaient tous de rage lorsque la présence du parasite avait été constatée. (242 fois l'auteur rencontra le parasite dans la corne d'Ammon, 15 fois dans la moelle allongée, une fois dans la moelle épinière); la démonstration réussit même dans 31 cas, où les organes n'étaient plus frais. Dans une deuxième série d'expériences, v. RATZ rencontra les « corps de Negri » 117 fois sur 128 cas; 11 fois l'épreuve expérimentale donna un résultat positif, tandis que l'examen microscopique demeura négatif. L'auteur admet que dans quelques cas de résultat négatif il s'agit de formes très petites, difficiles à reconnaître; il cite un cas chez lequel, dans les cellules ganglionnaires presque normales, il rencontra des corps qui ressemblaient aux corps « de Negri »; il ne fit pas de diagnostic positif, et au contraire l'épreuve expérimentale donna un résultat positif.

PIRONE, à l'Institut de Médecine expérimentale de Pétersbourg (service de la rage) (67), sur 766 cas, 8 fois seulement put constater « l'absence vraie » des « corps de Negri ».

Les statistiques de l'Institut für Infektionskrankheiten de Berlin sont à ranger parmi les plus nombreuses et les plus intéressantes qu'on ait publiées au sujet de la valeur pratique de

la démonstration des « corps de Negri » dans le diagnostic de la rage. Je me rapporte aux travaux de BOHNE (10), de TÖPFER (83), de LENTZ (37), de J. KOCH (34). Dans son rapport 1906-1907, LENTZ résume toutes les observations faites jusqu'à cette époque. En 1905-1906 furent examinés 349 animaux; chez 204, la recherche des « corps de Negri » donna un résultat positif et l'épreuve expérimentale confirma le diagnostic de rage; les deux examens donnèrent un résultat négatif chez 108; chez les 37 autres, au contraire, l'examen microscopique n'avait pas décelé la présence de « corps de Negri », tandis que les inoculations aux animaux démontrèrent qu'il s'agissait vraiment de rage. En 1906-1907 furent examinés 111 cas; présence de « corps de Negri » dans 52, absence dans 56; chez 3 « corps de Negri » absents, et épreuve expérimentale positive. A partir de cette époque, l'Institut supprime l'épreuve expérimentale pour tous les cas où l'examen microscopique a démontré la présence des « corps de Negri », c'est-à-dire que dans tous ces cas le diagnostic est posé sur le seul examen microscopique; et l'auteur fait remarquer les avantages considérables de cette méthode, au point de vue de la rapidité et de l'économie.

Dans son rapport (1908-1911) (34), J. KOCH résume ses observations sur 688 animaux suspects de rage, dont 335 positifs, 339 négatifs (les résultats sont résumés en bloc, sans mentionner la correspondance ou la différence entre épreuve microscopique et épreuve expérimentale).

Très intéressantes aussi les statistiques de l'Institut d'Hygiène de l'Université de Breslau (service de la rage).

Dans les comptes rendus de 1906-1907, OSTERMANN (69) fait connaître 117 cas de diagnostic microscopique de la rage. 78 fois la démonstration des « corps de Negri » donna un résultat positif, 29 fois négatif, et l'épreuve expérimentale fit respectivement admettre et exclure l'infection rabique; 10 fois au contraire l'épreuve biologique fut positive, tandis que la recherche des parasites avait été négative.

En 1907-1908, HEYMANN (30) rapporte 192 examens, dont 109 positifs, 68 négatifs (dont 45 confirmés par l'épreuve expérimentale); en outre, 15 positifs à l'épreuve expérimentale et négatifs à la recherche des « corps de Negri ». Dès maintenant

l'Institut d'Hygiène de Breslau supprime l'épreuve expérimentale dans les cas où l'examen microscopique a démontré les « corps de Negri ». Lorsque l'examen microscopique a donné un résultat négatif, on fait les inoculations aux animaux seulement si l'animal suspect avait mordu des personnes. L'auteur fait remarquer que, dans la pratique courante, il y a des circonstances défavorables au résultat de l'examen microscopique, circonstances qui sont surtout représentées par le mauvais état de conservation des cerveaux qui arrivent à l'examen, par l'inexpérience du chercheur et par la recherche un peu hâtive. Il est convaincu que dans certains cas l'examen microscopique aurait donné un résultat positif si l'on avait cherché plus soigneusement, par exemple en répétant l'examen dans d'autres parties de la corne d'Ammon et même dans d'autres régions du cerveau.

En 1908-1909 le même auteur (31), sur 203 examens, obtint 109 cas positifs, 79 négatifs; 15 fois épreuve microscopique négative et épreuve expérimentale positive.

En 1909-1910 (32), sur 127 examens (dont 55 positifs, 75 négatifs), 4 fois HEYMANN n'observe pas de parasites, tandis que l'inoculation aux animaux démontre qu'il s'agit de rage.

En 1910-1911, PRAUSSNITZ (70), sur 113 animaux (62 positifs, 43 négatifs), 8 fois ne rencontre pas les « corps de Negri », tandis que l'épreuve expérimentale conduit à la conclusion que l'animal était enragé.

Tout récemment, MANOUÉLIAN, de l'Institut Pasteur de Paris (44), a publié des observations intéressantes.

Il a observé 201 sujets : 106 fois il y eut présence des « corps de Negri » et épreuve expérimentale positive; 82 fois absence des « corps de Negri » et épreuve expérimentale négative; 4 fois absence des « corps de Negri » et épreuve expérimentale positive. Un fait qui peut paraître étrange, c'est le suivant : dans les 9 autres cas, l'auteur constata la présence des « corps de Negri » et l'épreuve expérimentale négative. C'est la seule observation de ce genre parmi les nombreuses publiées. Mais ces 9 cas ne peuvent nullement diminuer la signification de spécificité des « corps de Negri ». L'auteur même, en effet, donne des raisons assez satisfaisantes de ce fait étrange et qui n'a été observé par aucun des auteurs précédents. « Est-ce

parce que le virus était détruit ou, étant rare dans le bulbe des animaux, était-il inoculé en quantité insuffisante? Est-ce encore parce que les cobayes inoculés étaient réfractaires, ou la maladie a-t-elle demandé une incubation trop longue? D'autre part, nous savons qu'il y a des cas où l'inoculation intracérébrale donne des résultats positifs alors que l'inoculation intramusculaire reste négative. Et comme, pour des raisons d'ordre spécial, au service de la rage, on emploie généralement la voie intramusculaire (muscle du cou), il est probable que dans ces 9 cas on a eu affaire à la rage. »

A ces considérations MANOUÉLIAN ajoute deux exemples très démonstratifs : il s'agit de deux cas de rage humaine, dans lesquels on pratiqua en même temps l'inoculation intramusculaire chez le cobaye et l'inoculation intracérébrale chez le lapin. Les lapins moururent et présentèrent les « corps de Negri » dans le système nerveux, ainsi que le système nerveux des deux cas de rage humaine ; les cobayes, au contraire, ne présentèrent rien d'anormal : « si l'on s'était contenté d'inoculations intramusculaires chez les cobayes, l'épreuve expérimentale eût été négative ».

La nouvelle méthode de diagnostic rapide est adoptée aussi à l'Institut Pasteur de S. Paulo (Brésil). Son directeur, le D^r CARINI, relate 138 de ces examens en 1909 (13), 81 en 1910 (14), 78 en 1911, 94 en 1912 (15). CARINI dirige ses recherches sur la corne d'Ammon et le cervelet ; s'il réussit à mettre en évidence les « corps de Negri », il renonce à l'épreuve expérimentale, qu'il exécute seulement dans les cas négatifs.

La recherche des « corps de Negri », dans les cas suspects de rage se fait systématiquement aussi, depuis 1905, à l'Instituto Nacional de Higiene Alfonso XIII de Madrid, comme on peut le voir dans les rapport du D^r MURILLO, directeur du service de la rage (32).

Les notices et les chiffres que j'ai rapportés seraient suffisants à eux seuls pour démontrer la valeur pratique des études de A. NEGRI au point de vue de l'hygiène sociale ; il s'agit, en effet, d'une maladie dans laquelle le traitement prophylactique peut conduire à des résultats favorables, mais seulement lorsque ce traitement est précoce.

Les chiffres que je vais rapporter n'apportent aucune nouvelle démonstration de l'utilité et des avantages de la nouvelle méthode de diagnostic rapide de la rage. Cependant je ne crois pas inutile d'apporter la modeste contribution de mes observations personnelles. Elles furent recueillies à l'Institut Antirabique de Milan.

L'Institut Antirabique de Milan fut le premier à connaître le diagnostic de la rage au moyen de la recherche des « corps de Negri » ; en effet, son directeur, le D^r SEGRÈ, avait mis à la disposition du D^r NEGRI tout son matériel rabique. Ils provenaient en grande partie de l'Institut de Milan, les cas qui firent l'objet de la première communication de Negri sur le diagnostic rapide de la rage (55), de même que les cas de nos mémoires successifs, (le mien) (41) et celui en collaboration avec M. MACCHI (43) sur le même sujet. A partir de 1904, je fus chargée de faire systématiquement le diagnostic microscopique de tous les animaux suspects de rage qui, chaque année, arrivent très nombreux à l'Institut de Milan. Mon expérience me donne ainsi la possibilité d'apporter ici les conclusions qu'on peut tirer d'un grand nombre d'observations, les plus nombreuses qui aient été publiées jusqu'à ce jour.

Je suis heureux de faire ce rapport, parce que j'ai la conviction que, de l'examen général de tous les cas communiqués jusqu'ici, ainsi que des miens, on pourra tirer des conclusions et des considérations très intéressantes au point de vue pratique.

Les principes fondamentaux sur lesquels se base le diagnostic de la rage par la démonstration du parasite spécifique sont les suivants :

1° Les « corps de Negri » se trouvent exclusivement et constamment chez les animaux enragés, et chez les animaux de toutes espèces ;

2° L'apparition des « corps de Negri » dans le système nerveux se fait en même temps que l'apparition des premiers symptômes de la maladie ;

3° Dans la rage furieuse, le siège de prédilection du parasite est la corne d'Ammon.

De ces propositions découle la déduction pratique que, chez les

animaux atteints de la rage furieuse et morts ou bien tués lorsque la symptomatologie de la maladie était bien évidente, la démonstration du parasite spécifique dans les cellules nerveuses de la corne d'Ammon suffit à établir le diagnostic d'hydrophobie.

D'où résulte que la recherche du parasite aboutira à un résultat négatif lorsque l'animal aura été sacrifié dans la période d'incubation de la maladie; suivant nos connaissances sur la distribution du microorganisme dans le système nerveux en rapport avec les différentes formes cliniques de la rage, l'examen de la corne d'Ammon donnera aussi un résultat négatif dans les cas de rage paralytique.

Dans la pratique courante, c'est probablement dans ces cas que le résultat de l'épreuve expérimentale ne s'accorde pas avec le résultat de l'examen microscopique (il faut en outre rappeler les cas, peut-être moins nombreux, de distribution anormale des formes endocellulaires dans le système nerveux). Cependant, au point de vue pratique, c'est sûrement dans un très petit nombre de cas que l'homme est mordu par des animaux atteints de rage paralytique ou bien par des animaux dans la période d'incubation de la maladie. En effet, l'examen de la corne d'Ammon permet, dans la grande majorité des cas, d'affirmer ou d'exclure le diagnostic de rage.

Tous les auteurs s'accordent sur l'opportunité de s'adresser, pour leurs recherches, à la corne d'Ammon, pour la démonstration des « corps de Negri ». Cependant, pour des raisons faciles à comprendre et qui dépendent de sympathies ou de préférences individuelles, on peut dire que chaque Institut, même chaque auteur, propose une méthode à lui, destinée à faciliter et abréger la démonstration des « corps ».

Je ne désire pas rapporter tous les moyens qui ont été proposés pour la démonstration du parasite; je renonce d'abord à tous ceux qui ont pour objet l'étude de la morphologie et de la structure du parasite; je me rapporte seulement à ceux qui ont été proposés au but diagnostic.

VOLPINO (Institut antirabique de Turin) (84). — Le simple examen à l'état frais, en délayant quelques fragments de tissu dans une goutte de solution d'acide acétique très dilué, est très souvent suffisant pour établir le diagnostic de rage.

Si l'examen à l'état frais donne un résultat négatif, l'auteur procède de la manière suivante : On fait des coupes transversales de la corne d'Ammon, de 3 à 4 millimètres d'épaisseur, que l'on met dans des tubes à essai avec 4 ou 5 cent. cubes de solution d'acide osmique à 1:100. Après cinq ou six heures, et même plus, les morceaux de la corne d'Ammon, fortement noircis par l'action de l'acide osmique, sont soumis au lavage dans l'eau courante pendant une demi-heure, voire même une heure ou plusieurs heures; on passe à l'alcool absolu et, après trois ou quatre heures, on sectionne à main libre avec un rasoir. Cellules nettement colorées en café clair; le noyau plus pâle et le petit noyau fortement coloré; les « corps de Negri » presque semblables au nucléole; on peut cependant, en examinant attentivement, apercevoir dans leur intérieur des espaces clairs, comme des vacuoles, disposés régulièrement. Cette méthode a été adoptée aussi par ABBA et BORMANS (1).

VOLPINO recourt aussi aux dilacérations de fragments très petits du tissu, après une macération de quarante-huit heures dans l'alcool au tiers.

BERTARELLI (Institut d'Hygiène de l'Université de Turin) (7,8). — Il fixe de petits morceaux de la corne d'Ammon au formol à 10 p. 100 pendant deux heures; puis il fait des coupes de 10 microns avec le microtome à congélation. Distension des coupes sur l'eau, collage sur la lamelle; sécher pendant quelques heures dans le thermostat. Coloration avec le Romanowsky, différenciation dans l'alcool jusqu'à ce que les coupes paraissent complètement décolorées. Déshydratation, xylol, montage en baume.

Noyaux et protoplasma cellulaires bleus, globules du sang rouges; corps de Negri en rose pâle.

Cette méthode demande huit à dix heures. Après la même fixation, on peut colorer avec le Mann.

FASOLI (Institut de Pathologie générale de l'Université de Bologne) (23). — Fixation dans le liquide de Zenker ou dans la solution aqueuse de sublimé (avec ou sans acide acétique). Coloration des coupes dans une solution aqueuse d'éosine (chauffée) pendant cinq à dix minutes. Lavage à l'eau.

Différenciation dans une solution de soude caustique dans l'alcool (IV à V gouttes de solution alcoolique ou aqueuse de soude, dans 50 cent. cubes d'alcool environ). Lavage à l'eau.

Colorer rapidement dans une solution aqueuse diluée de bleu de méthylène (jusqu'à ce que les coupes prennent une couleur violacée claire).

Laver à l'alcool pendant une à deux minutes.

Déshydratation dans l'alcool absolu, xylol, baume du Canada.

MURILLO (Institut national d'Hygiène Alfonso XIII, Madrid) (51). — Des frottis de corne d'Ammon sont placés dans le thermostat pendant deux heures. On fixe dans l'alcool-éther et on met dans la solution colorante. L'auteur emploie le Giemsa (I goutte pour chaque centimètre cube d'eau si la coloration dure plus de vingt heures, II gouttes pour chaque centimètre cube d'eau si la coloration dure trois à quatre heures). Décoloration dans l'alcool absolu; sécher avec le papier buvard, monter en baume.

BOHNE (Institut für Infektionskrankheiten, Berlin) (40). — De petits morceaux de corne d'Ammon (1/2-1/3 de millimètre environ d'épaisseur) sont fixés dans 15 cent. cubes d'acétone pur à 37 degrés, jusqu'à ce que les pièces aient acquis une certaine consistance, analogue à celle qui arrive pendant le durcissement dans l'alcool (trente à quarante-cinq minutes environ). Après, on les porte dans la paraffine à 55 à 60 degrés, pendant soixante à soixante-quinze

minutes (inclusion rapide de Henke et Zeller). On fait des coupes de 6 microns que l'on colle sur le porte-objet au moyen d'une solution de gomme arabique; on sèche à l'étuve à 60 degrés. On colore avec le Mann d'une demi à quatre minutes (35 cent. cubes de solution aqueuse de bleu de méthyle, 35 cent. cubes de solution aqueuse d'éosine 1 : 100, 100 cent. cubes d'eau distillée). Lavage rapide dans l'eau; alcool absolu; quinze à vingt secondes dans l'alcool alcalinisé (30 cent. cubes d'alcool absolu et 5 gouttes de solution de soude dans l'alcool absolu, 1 : 100). Passer rapidement à l'alcool absolu; une minute dans l'eau de fontaine; une à deux minutes dans l'eau légèrement acidifiée par l'acide acétique. Déshydratation, éclaircissement, baume de Canada.

Le procédé entier s'accomplit dans trois heures environ.

WILLIAMS et LOWDEN (The Research Laboratory of the Department of Health, New-York City) (85). — Faire des frottis, sécher à l'air.

Fixer à l'alcool méthylique, cinq minutes.

Colorer pendant dix minutes dans un mélange à parties égales de solution de Giemsa et d'eau distillée. Le tissu se colore en bleu; les globules rouges en jaunâtre; le plasma des cellules nerveuses en bleu; les noyaux en rouge; les nucléoles en bleu. Les parasites se colorent en rouge, les formations internes en bleu.

Dans quelques cas, les auteurs colorent aussi avec le Mallory. Ils proposent aussi la méthode suivante :

Fixer les frottis dans le liquide de Zenker, une demi-heure; laver à l'eau; alcool iodé, un quart d'heure; alcool absolu, une demi-heure; éosine, solution aqueuse, vingt minutes; laver à l'eau.

Solution de bleu de méthylène, 15 minutes; différenciation dans l'alcool à 95 degrés, 1 à 5 minutes; sécher avec du papier buvard.

Les corps de Negri présentent la substance fondamentale colorée en rouge Magenta, les corpuscules centraux en bleu foncé. Plasma des cellules nerveuses bleu clair, noyaux bleu foncé, globules rouges du sang rouge. La même méthode donne aussi de bonnes coloration sur les coupes.

FROTHINGHAM (Bacteriological Laboratory of the Harvard Medical School) (25). — I. — Fixer les pièces dans le liquide de Zenker pendant quatre heures.

Alcool à 95 degrés, quelques heures; alcool absolu, une demi-heure; alcool absolu, chloroforme, parties égales, 20 à 30 min.; chloroforme, 20 à 30 min.

Solution saturée de paraffine dans le chloroforme, 20 à 30 minutes; paraffine à 55 degrés, une heure et demie; inclusion; collage des coupes par l'albumine glycinée; sécher pendant une heure et demie à 55 degrés.

Xylol, alcool absolu, alcool à 95 degrés; alcool iodé à saturation, 5 à 10 minutes; alcool à 95 degrés, eau. Colorer pendant 15 à 30 minutes dans un mélange à parties égales de solution de Unna et de solution aqueuse d'éosine, 5 : 100; laver à l'eau; solution de Unna, 3 à 5 minutes; laver à l'eau.

Différencier dans l'alcool à 95 degrés, en contrôlant au microscope; alcool absolu, xylol, baume.

Bleu de Unna :

Méthylénblau (Grübler)	1,0
Carbonate de calcium	4,0
Eau	100,0

Solution colorante de Unna :

Bleu de Unna	1,0
Eau	1,0

II. — Préparation par impression. Fixation au Zenker, une heure et demie; laver à l'eau; alcool à 95 degrés, 5 à 10 minutes; alcool iodé à saturation. 5 à 10 minutes; alcool à 95 degrés; eau; coloration comme pour les coupes (I).

Les corps cellulaires et les noyaux se colorent en bleu pâle, les nucléoles en rouge foncé, les globules rouges en rouge pâle. Les parasites colorés en rouge pourpre pâle montrent à l'intérieur des images bleues, de différentes formes et dimensions.

III. — Les préparations par impression peuvent être aussi traitées de la manière suivante : Sécher dans l'air; alcool à 95 degrés, 5 à 10 minutes; alcool iodé, 10 minutes; alcool à 95 degrés; eau, coloration comme pour les coupes.

IV. — Encore pour les préparations par impression. Sécher et fixer à chaleur faible; solution saturée alcool-éosine, 15 minutes; eau; bleu de méthylène alcalin, 3 à 5 minutes; eau; différenciation dans l'alcool à 95 degrés, etc.

V. — Dans une note postérieure, enfin (26), l'auteur recommande la méthode de van Gieson comme la plus convenable pour la coloration des « corps de Negri »; mais il modifie de cette façon la solution colorante :

Eau distillée	20 cent. cubes.
Solution saturée alc. fuchsine	3 gouttes.
Solution saturée alc. bleu de méthylène.	1 goutte.

BASCHIERI (Institut antirabique de Faenza) (5). — Les frottis humides sont fixés pendant 2 à 3 minutes dans l'alcool absolu. Coloration pendant 5 minutes au moins dans :

Éosine (spiritus löslich Grüberl).	1 partie.
Alcool absolu	100,0 cent. cubes.
Acide acétique glacial.	0,3 —
Faire dissoudre à chaud, filtrer après refroidissement.	

Lavage à l'eau pendant 10 à 20 minutes; colorer pendant 1 minute environ dans une solution de bleu de méthylène à 0,5 p. 100 dans l'eau distillée; laver à l'eau, 10 à 20 minutes; différencier dans l'alcool à 90-95 degrés pendant 30 à 40 minutes; alcool absolu, xylol, baume.

Les éléments cellulaires ressortent en bleu sur le fond de la préparation, décolorée ou faiblement colorée en rose; les globules rouges sont rouge éosine. Les « corps de Negri » sont rouge violacé et montrent, à l'intérieur, des vacuoles et des corpuscules basophiles. Tout le procédé demande environ 10 minutes.

LENTZ (Institut für Infektionskrankheiten de Berlin) (36). — L'auteur propose deux méthodes de colorations, qui donnent de bons résultats, sur les frottis et sur les coupes.

Frottis. — On pratique une section perpendiculaire de la corne d'Ammon et on enlève une portion de tissu correspondant à la région qui renferme les grandes cellules. Et on fait des frottis que l'on fixe humides dans l'alcool méthylique pendant une minute. On lave ensuite dans l'alcool éthylique et on colore.

Coupes. — Elles sont préparées suivant la méthode de Bohne. Les coupes et les frottis sont colorés par les solutions suivantes :

1 ^o Éosine extra B-Höchst	0,5 cent. cubes.
Alcool éthylique	100,0 —
2 ^o Bleu de méthylène de Löffler :	
Solution alc. saturée bleu de méthylène	
B. Patent-Höchst	30,0 cent. cubes.
Solution de soude caustique	100,0 —

Pour différencier :

1 ^o Alcool alcalinisé :	
Alcool absolu	30,0 cent. cubes.
Solution alc. soude caustique 1 p. 100	5 gouttes.
2 ^o Alcool acidifié :	
Alcool absolu	30,0 cent. cubes.
Acide acétique, 50 p. 100	1 goutte.

Dans la coloration B, on fait aussi un mordantage avec la solution de Lugol :

Iode	1 cent. cube.
Iodure de K	2 —
Eau jusqu'à	300 —

Coloration A. — Colorer dans la solution d'éosine, 1 minute; laver à l'eau; colorer dans la solution de bleu de méthylène, 1 minute; laver à l'eau; sécher soigneusement avec du papier buvard.

Différencier dans l'alcool alcalinisé jusqu'à ce que la préparation garde encore une faible coloration d'éosine.

Différencier dans l'alcool acidifié jusqu'à ce que, dans les coupes, les stries des cellules ganglionnaires ressortent fortement colorées en bleu; lorsqu'il s'agit de frottis, la différenciation doit arriver jusqu'à ce que, dans les parties plus minces du frottis, la coloration bleue ait complètement disparu; laver rapidement dans l'alcool absolu.

Coupes. — Xylol, baume de Canada, lamelle.

Frottis. — Sécher, examiner avec l'objectif à immersion sans lamelle.

Coloration B. — Colorer dans la solution d'éosine, 1 minute; laver à l'eau; colorer dans la solution de bleu de méthylène, 1 minute; laver à l'eau; mordancer avec la solution de Lugol, 1 minute; laver à l'eau.

Différencier dans l'alcool méthylique jusqu'à disparition de la coloration bleue; la préparation devient complètement rouge; laver à l'eau; colorer dans la solution de bleu de méthylène; laver à l'eau, sécher et différencier comme dans la coloration A.

Le fond de la préparation est rose ou même complètement décoloré; le protoplasma des cellules nerveuses est bleu pâle; les noyaux des cellules nerveuses bleu un peu plus foncé, jusqu'au bleu noir; globules rouges rouge cinabre. Corps de Negri colorés en rouge cramoisi; à l'intérieur, des corpuscules colorés en bleu plus ou moins foncé. Dans les préparations colorées suivant B, les corpuscules internes des « corps de Negri » présentent une coloration plus intense, du bleu foncé jusqu'au noir.

VAN GIESON (Research Laboratory, New-York City, Health Department) (28). — Un petit morceau de substance grise, de la grosseur d'un pois, est placé sur le porte-objet; dessus on dépose une lamelle, en exerçant une faible pression. On fait glisser la lamelle sur le porte-objet et on arrive ainsi à avoir une bonne préparation, avec de nombreuses cellules nerveuses isolées et conservées.

Sécher la préparation dans l'air, ou bien (ce qui est mieux) fixer pendant quelques secondes dans l'alcool méthylique. Recouvrir avec la solution colorante, chauffer légèrement sur la flamme, jusqu'à développement de vapeurs. La solution colorante est la suivante :

Solution alc. saturée Rosanilinviolet	2 gouttes.
Solution aq. saturée Méthylenblau	1 goutte.
Eau distillée	10 cent. cubes.

la solution doit être préparée fraîche chaque fois. Laver à l'eau pendant 1 à 2 minutes, sécher, observer au microscope.

Les « corps de Negri » se colorent d'une façon caractéristique en rouge vif; les granules de chromatine en bleu.

HARRIS (City Bacteriologist and Pathologist, St-Louis, Mo.) (29). — Fixer les frottis dans l'alcool méthylique, 1 minute; laver rapidement dans l'eau; colorer pendant 1 à 3 minutes dans une solution alcoolique saturée d'éosine (alcool 95°); la solution doit être de deux mois au moins; laver dans l'eau; colorer pendant 5 à 15 secondes dans une solution fraîche de bleu de méthylène de Unna; laver dans l'eau; décolorer dans l'alcool à 95 degrés; alcool absolu, xylol, baume.

RUCKER (73) fait des frottis et il les colore avec le liquide de Giemsa pendant trois heures, ou bien par le procédé de van Gieson. La méthode rapide de Giemsa donne des résultats moins satisfaisants.

NERI (Institut d'hygiène de l'Université de Pisa) (63). — Frottis fixés dans l'alcool absolu, ou coupes apprêtées selon la méthode Henke et Zeller (lorsque l'examen des frottis a donné un résultat négatif). Frottis et coupes sont colorés pendant dix minutes en éosine iodée :

Eosine.	4,0
Iode.	0,1
Iodure de potassium.	2,2
Eau distillée.	100,0 cent. cubes.

(On dissout d'abord 0 gr. 1 d'iode et 0 gr. 2 d'iodure de potassium dans la quantité la plus petite d'eau distillée et l'on dilue à 50 cent. cubes cette solution iodo-iodurée. D'autre côté, on dissout 1 gramme d'éosine en 50 cent. cubes d'eau distillée; on mélange ces deux solutions à froid; on filtre; on conserve en bouteille à l'émeri.)

Lavage soigneux à l'eau distillée; coloration pendant cinq minutes dans une solution aqueuse, 1 : 1000 de bleu de méthylène; lavage rapide à l'eau distillée; différenciation dans l'alcool 95 degrés; déshydratation, éclaircissement, montage.

Les « corps de Negri » se distinguent de tout autre élément à cause de leur teinte rouge violacé brillante, qui se détache du bleu pâle du protoplasma cellulaire et du bleu foncé des noyaux et des nucléoles. Les globules rouges du sang prennent le rouge de l'éosine, mais leur teinte vire au rose. Le fond de la préparation est coloré faiblement en rose. Le bleu de méthylène reste fixé sur les corpuscules basophiles contenus dans les vacuoles des « corps de Negri ».

STUTZER (Institut für Infektionskrankheiten, Berlin) (82). — Les coupes en paraffine sont portées à l'eau à travers du xylol et de l'alcool.

Cinq à quinze minutes dans le bleu de méthylène de Löffler; on en fait

une solution dans l'eau distillée, jusqu'à obtenir un liquide transparent dans le tube d'essai. Il est mieux de colorer plutôt fortement que trop faiblement.

Différencier dans une solution de tannin 1 p. 100. La durée de la différenciation est variable, en rapport avec l'intensité de la coloration et avec l'épaisseur des coupes. Contrôler au microscope.

Laver à l'eau, sécher avec du papier buvard, passer rapidement par l'alcool absolu; xylol, baume de Canada.

Les « corps de Negri » se colorent en rouge violacé, les cellules nerveuses en bleu. Lorsque la différenciation est parfaite, on voit les détails de structure du parasite.

MOON (50). — Des frottis, séchés dans l'air et fixés dans l'alcool méthylique ou dans l'alcool éthylique, pendant deux minutes, sont colorés avec la solution suivante :

Sol. sat. rosaniline dans l'acétone.	2-3 gouttes.
Sol. aq. demi-sat. bleu de méthylène.	2 —
Eau.	10 cent. cubes.

MARTINI (Institut antirabique de Florence) (46). — L'auteur place un petit morceau de la corne d'Ammon (fraîche ou fixée dans l'alcool) dans une petite capsule de porcelaine; au moyen d'un tube à essai (à la façon d'un pilon) il fait une émulsion de la substance nerveuse dans une petite quantité (6-7 gouttes) de glycérine; on arrive ainsi à obtenir une pâte homogène, épaisse, visqueuse. Par un petit entonnoir (à travers un filtre) on fait un mélange de ladite émulsion et de 2 gouttes d'une solution de bleu marin dans l'alcool méthylique absolu, 0,30 p. 100; quelques minutes après, on ajoute une goutte (préalablement filtrée) d'une solution saturée d'éosine dans l'alcool méthylique 95 degrés. On agite, on porte une goutte du mélange coloré sur un porte-objet et l'on couvre avec une lamelle.

Sur le fond rose de la préparation ressortent les cellules nerveuses colorées en bleu clair (protoplasma et noyau) et bleu foncé (nucléol). Les globules rouges du sang sont rouge éosine. Les « corps de Negri » sont violacés, et présentent une évidente structure vacuolaire.

MANOUELIAN (Institut Pasteur de Paris) (45). — On enlève, à l'aide de ciseaux très fins, de très minces tranches de corne d'Ammon et on les immerge dans le mélange suivant :

Acétone 56 à 58 degrés.	50 cent. cubes.
Teinture d'iode.	6 gouttes.

Trente minutes après, on renouvelle l'acétone, qui, cette fois, ne doit pas contenir d'iode, et on procède, un quart d'heure après, à l'inclusion à la paraffine, qui peut ne durer que trente minutes et même moins. Les coupes sont colorées par la méthode de Mann (de quinze minutes à deux heures dans la solution colorante, de 38 à 40 degrés).

En moins d'une heure, on peut obtenir de bonnes préparations en procédant de la manière suivante :

Faire des frottis de corne d'Ammon rabique; fixer immédiatement à l'acétone iodé pendant quelques secondes; laver à l'eau courante pendant une minute; colorer avec le liquide de Mann pendant un quart d'heure, à chaud, etc.

(A suivre.)

ANTICORPS ET ESPÈCES ANIMALES

par C. LEVADITI et St. MUTERMILCH

Lorsqu'on administre le même antigène à des espèces animales sensibles, on provoque la production d'anticorps doués de propriétés particulières quant à leur façon d'agir sur cet antigène. Ces anticorps impriment à l'antigène des modifications appréciables surtout *in vitro*, telles que l'agglutination, la précipitation, la lyse ou l'adsorption du complément; d'après leur mode d'action, on les classe dans la catégorie des précipitines, des lysines, des agglutinines, etc. En général, on tend à attribuer aux anticorps deux caractères de spécificité : d'abord, leur action exclusive sur l'antigène qui a servi à leur préparation, ensuite leur façon de modifier l'état de cet antigène. On tend à admettre que l'agglutinine typhique, par exemple, est différente de la précipitine qui trouble les filtrats préparés avec les cultures du bacille d'Eberth; de son côté, cette précipitine serait de toute autre nature que la lysine, ou la substance qui provoque le phénomène de la fixation du complément. Cette façon de voir n'est cependant pas acceptée unanimement; Bordet (1), en particulier, considère la précipitation, ou l'agglutination, ou encore la lyse, comme des modes d'action particuliers d'un seul et même anticorps, unique résultat de l'intervention de l'antigène.

Le problème est très complexe et, dans l'état actuel de nos connaissances, nul moyen ne s'offre pour le résoudre d'une manière satisfaisante et définitive. Mais à côté de lui, s'en pose un autre, non moins intéressant et que voici : considérons une des façons d'agir des anticorps engendrés par un antigène donné, la *lyse*, par exemple, et supposons que cet antigène soit administré, dans les mêmes conditions, non pas à une espèce animale, mais à plusieurs espèces, plus ou moins éloignées les unes des autres dans l'échelle des êtres vivants. Les lysines

(1) BORDET, Z. für Immunitätsf. Referate, 1909, p. 1.

produites par ces diverses espèces animales, sous l'influence de cette injection d'antigène, sont-elles identiques, ou bien chaque espèce imprimera-t-elle des caractères particuliers à la lysine qu'elle fabrique? En d'autres termes, *y a-t-il des différences marquées entre les agglutinines ou les lysines, ou les précipitines contenues dans les sérums d'espèces animales plus ou moins éloignées l'une de l'autre, et soumises à l'influence d'un même antigène?* Prenons un exemple concret : injectons à des cobayes, des lapins, des rats et des poules, du sérum de cheval, et admettons qu'après un certain nombre d'injections, le sérum de ces espèces animales aura acquis la propriété de précipiter *in vitro* le sérum de cheval. L'expérience montrera que les quatre sérums agiront avec une intensité inégale, il y aura bien des dissemblances quantitatives entre eux, mais tous modifieront de la même manière l'antigène qui leur a donné naissance; il y aura précipitation et rien de plus. Devons-nous conclure de là que les quatre précipitines, cobaye, lapin, rat et poule, sont absolument identiques, parce qu'elles modifient de la même façon l'antigène, ou bien possédons-nous quelques moyens capables de révéler des écarts appréciables entre ces anticorps?

Il se peut, en effet, que l'excitation imprimée par l'antigène aux organes producteurs d'anticorps ne soit pas la même chez toutes les espèces animales; il se peut également que chacune de ces espèces réagisse à sa façon vis-à-vis d'un antigène dont les qualités excito-sécrétrices sont les mêmes, quel que soit l'animal soumis à l'expérience. Dans ce cas, chaque espèce, en élaborant un anticorps lytique, ou précipitant, par exemple, y ajouterait quelque chose qui lui appartient en propre et qui conférerait à cet anticorps des propriétés spécifiques, en plus de ses qualités lytiques ou précipitantes.

Le problème n'est pas aisé. La chimie est impuissante dans ce domaine de l'analyse des anticorps, étant donnée la constitution complexe des matières protéiques qui servent de support à ces anticorps. D'un autre côté, on ne saurait s'adresser aux réactions de précipitation ou de fixation du complément pour différencier les anti-sérums élaborés par les diverses espèces animales, attendu que ce serait aborder de la sorte la question des anti-anticorps; or, on sait actuellement

que tout essai de production d'un anti-anticorps se complique d'une formation d'anti-albumines non spécifiques, qui n'ont très probablement rien à voir avec l'intervention des véritables anticorps en tant qu'antigènes.

Nous nous sommes demandé s'il était possible de tenter l'étude de cette question en utilisant, comme indicateur, un *antigène vivant* capable de s'adapter parfaitement aux anticorps fabriqués par les diverses espèces animales, et permettant ainsi de saisir les différences subtiles qui peuvent exister entre ces anticorps. Nous avons tout d'abord pensé aux spirilles pathogènes, dont l'un de nous, en collaboration avec Roché (1), a montré la faculté de s'adapter aux anticorps lytiques pour créer des races anticorps résistantes. Mais des difficultés d'ordre technique nous ont fait abandonner cette idée et nous avons porté notre choix sur les trypanosomes. On sait, depuis les constatations de Franke (2) et surtout de Mesnil et Brimont (3), que ces flagellés s'adaptent aux anticorps préventifs et se transforment plus ou moins rapidement en des variétés anticorps-résistantes spécifiques. D'un autre côté, nous avons nous-mêmes étudié le mécanisme qui préside à la création de ces races de trypanosomes réfractaires, formulé la *théorie de la sélection*, et indiqué, en nous inspirant des données énoncées par Ehrlich (4), un procédé facile et rapide permettant la création de races résistantes, par action des trypanolysines *in vitro* (5). Actuellement, rien n'est plus aisé que la préparation d'une telle race; il suffit, pour cela, de faire agir sur une espèce de trypanosomes donnée, des dilutions variables d'un sérum trypanolytique approprié, d'injecter le mélange à des souris et de choisir, parmi les animaux injectés, ceux qui s'infecteraient au bout de cinq à six jours. Leurs trypanosomes se montreront plus ou moins résistants à l'égard de l'action lytique du sérum employé.

Nous avons donc entrepris des expériences, dans le but indiqué plus haut, d'après le plan suivant :

(1) LEVADITI et ROCHÉ, *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, 1907, t. LXII, p. 619 et 815.

(2) FRANKE, *Inaug. Dissert. Giessen*. G. Fischer, Jena.

(3) MESNIL et BRIMONT, *Annales de l'Institut Pasteur*, 1909, n° 2.

(4) EHRLICH, *Münch. mediz. Woch.*, 2 février 1909.

(5) LEVADITI et MUTERMILCH, *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, 1909, p. 49.

1° Préparation de trypanolysines par injection de trypanosomes du Nagana (1) à cinq espèces animales plus ou moins éloignées les unes des autres : *cobaye*, *lapin*, *rat*, *poule* et *grenouille*.

2° Création de races de trypanosomes résistantes à chacun des anticorps trypanolytiques fabriqués par ces cinq espèces animales. Nous avons ainsi tenté d'obtenir cinq races de flagellés : *Cobaye-R*, *Lapin-R*, *Rat-R*, *Poule-R* et *Grenouille-R*.

3° Etude de ces races, au point de vue des affinités qui existent entre elles. Cette dernière question doit nous livrer la clef du problème. En effet, chacune de ces races représente, pour ainsi dire, *un miroir fidèle de l'anticorps qui a servi à sa préparation*, d'après le schéma ci-après :

Race <i>Cobaye-R</i>	Image de l'anticorps <i>Cobaye</i> .
Race <i>Lapin-R</i>	Image de l'anticorps <i>Lapin</i> .
Race <i>Poule-R</i>	Image de l'anticorps <i>Poule</i> .
Race <i>Rat-R</i>	Image de l'anticorps <i>Rat</i> .

Or, si l'étude de ces races, au point de vue de leurs affinités réciproques, nous montre qu'elles sont identiques morphologiquement et surtout biologiquement, nous serons amenés à conclure qu'à leur tour les anticorps trypanolytiques élaborés par les espèces animales soumises à l'expérience sont identiques. Par contre, tout écart entre les races de flagellés anticorps-résistantes indiquera l'existence de différences équivalentes entre les anticorps correspondants. Nous concluons, dans ce dernier cas, qu'un seul et même antigène déclenche la production d'anticorps différents, suivant l'espèce animale à laquelle on l'administre. Bien entendu, cette conclusion ne s'imposera qu'autant que les résultats des recherches faites avec des races de trypanosomes et des anticorps préparés à plusieurs reprises et dans les mêmes conditions, seront concordants et invariables.

Avant d'entrer dans le détail de nos recherches, nous désirons citer deux travaux antérieurs qui se rattachent à nos études. Le

(1) Les trypanosomes ont été aimablement mis à notre disposition par M. Mesnil.

premier est de Mesnil et Brimont (1) et concerne la résistance des trypanosomes à l'égard des antisérums provenant d'espèces animales différentes. Ces auteurs ont vu qu'une race de flagellés réfractaire au sérum d'un bouc, l'est aussi partiellement au sérum d'un chien, et *vice versa*. Le second travail, de Braun et Teichmann (2), se rapporte également à cette résistance qu'opposent les races réfractaires aux anticorps d'espèces animales diverses. Nous le citerons en détail au cours de ce mémoire.

I

CRÉATION DE LA RACE RÉSISTANTE AUX TRYPANOLYSINES DU COBAYE (Race Cobaye-R).

1. *Préparation des sérums.* — Le 28 février 1912, on injecte dans le péritoine de trois cobayes 0,1 cent. cube d'une dilution de sang de souris infectées avec des try. du Nagana.

	1 ^{er} mars.	3 mars.	6 mars.	
Cobaye n° 70	r.	n. r.	0	saigné.
Cobaye n° 71	r.	n. r.	0	saigné.
Cobaye n° 72	r.	n.	0	saigné.

2. *Préparation de la race Cob.-R.* — Le 8 mars. Les sérums sont inactivés à 56 degrés, pendant 30 minutes. On se sert de complément frais de cobaye.

IS INACT.	COMPL.	TRYP.	RÉSULTAT de trypanolyse 40 minutes à 37 degrés.	INJECTION à souris (péritoine).	DATES			
					9 mars.	10 mars.	11 mars.	12 mars.
0,1	0,3	1 g.	Compl. (1)	1	0	0	n. r.	N. r., tuée. Race Cob-R. essayée le 12 mars
0,01	0,3	»	Partiel.	2	r.	n.	+	
0,1 au 50°	0,3	»	Trace.	3	n. r.	n.	+	
0,1 au 100°	0,3	»	Trace.	4	n. r.	n.	+	

(1) Compl. : trypanolyse complète; Partiel : trypanolyse partielle; Trace : trace de trypanolyse; zéro : pas d'action.

(1) MESNIL et BRIMONT, *Annales de l'Institut Pasteur*, t. XXIII, p. 429, février 1909.

(2) BRAUN et TEICHMANN, *Versuche zur Immunisierung gegen Trypanosomen*. Jena, 1912, G. Fischer.

3. *Essai de la résistance de la race Cobaye-R.*

TUBES	IS. inact.	Còmpl.	Tryp.	TRYPANOSOMES		
				Race	Cob.-R.	Nagana.
1	0,1	0,3	1 goutte.	0		Compl.
2	0,01	0,3	»	0		Compl.
3	0,002	0,3	»	0		Trace.

Le mélange du tube 1 (IS. + race Cobaye-R) est injecté à une souris qui s'infecte dès le lendemain. Ses trypanosomes sont éprouvés le 14 mars (Race Cobaye-R₁).

IS.	COMPL.	TRYP.	RÉSULTATS 30 minutes à 37 degrés.
0,3	0,3	1 goutte.	0
0,1	0,3	1 goutte.	0

Donc, la race COBAYE-R₁ est bien réfractaire aux anticorps trypanolytiques de cobaye.

II

CRÉATION DE LA RACE RÉSISTANTE AUX TRYPANOLYSINES DU LAPIN
(Race Lapin-R).

1. *Préparation du sérum.* — Le 28 février 1912, on injecte, par voie veineuse, avec des tryp. Nagana, le lapin n° 69.

	3 mars.	6 mars.	
Lapin n° 69.	n. r.	0	saigné.

Le sérum est inactivé à 56 degrés pendant une demi-heure. On se sert de complément frais de cobaye.

2. *Préparation de la race Lapin-R.* — Le 8 mars.

IS.	COMPL.	TRYP.	RÉSULTAT 40 minutes à 37 degrés.	INJECTION à souris.	DATES				
					9 mars.	10 mars.	11 mars.	12 mars.	13 mars.
0,1	0,3	1 g.	Compl.	1	0	0	0	n. r.	Essais Race R ₂ n. r. +
0,01	»	»	Compl.	2	0	0	0	t. r.	
0,002	»	»	Compl.	3	0	0	r	n.	
0,001	»	»	Compl.	4	0	0	n. r. Essais Race R ₁		

a Essai de la race *Lapin-R₁* (0,001 IS).

IS.	COMPL.	TRYP.	TRYPANOSOMES		TRYPANOSOMES	
			Tube.	Lap. R ₁ .	Tube.	Nagana.
0,1	0,3	1 g.	1	Compl.	5	Complet.
0,01	»	»	2	Pr. compl.	6	»
0,002	»	»	3	Trace.	7	»
0,001	»	»	4	0	8	Presque complet.

Ce tableau montre que la race *Lapin-R₁* (obtenue avec 0,1 de sérum au 1/100) n'est que très faiblement réfractaire. Les mélanges 1-2-3 sont inoculés à trois souris. La marche de l'infection chez ces souris montre bien cette faible résistance de la race *Lapin-R₁*.

	12 mars.	13 mars.	14 mars.	15 mars.	16 mars.
Souris 1.	0	0	r.	n.	+
Souris 2.	0	t. r.	n. r.	t. n. +	
Souris 3.	tr.	n. r.	+		

b Essai de la race *Lapin-R₂* (0,1 de sérum).

IS.	COMPL.	TRYP.	TRYPANOSOMES	
			Lap.-R ₂ .	Nagana.
0,1	0,3	1 goutte.	0	Complet.
0,01	0,3	1 goutte.	0	»
0,002	0,3	1 goutte.	0	»

Le contenu du tube n° 1 est inoculé à une souris. Elle s'infecte dès le lendemain et ses trypanosomes se montrent réfractaires aux anticorps, comme le prouve le tableau suivant :

IS.	COMPL.	TRYP.	TRYPANOSOMES	
			Lap.-R ₂ .	Nagana.
0,3	0,3	1 goutte.	0	Complet.
0,1	0,3	1 goutte.	0	Complet.

La race *LAPIN-R₂* est donc bien réfractaire aux trypanolysines du lapin.

III

 CRÉATION DE LA RACE RÉSISTANTE AUX TRYPANOLYSINES DU RAT
 (*Race Rat-R*).

Les rats infectés avec les trypan. du Nagana ne font pas de crise spontanée. Aussi, pour préparer des anticorps trypanolytiques, en nous servant de cette espèce animale, avons-nous traité par l'arsénobenzol des rats en pleine infection. Le lendemain de l'injection du médicament, tous les trypan. disparaissaient de la circulation générale, et, quelques jours après, le sérum des rats traités contenait des anticorps trypanocides.

1. *Préparation du sérum.* — Le 24 février 1913, on infecte par voie péritonéale quatre rats avec du Nagana. Le 29 février, on administre le 606 et, le lendemain, on constate l'absence complète des trypan. circulants. Les animaux sont saignés le 7 mars, soit six jours après.

2. *Essai du sérum (le 8 mars) et préparation de la race Rat-R.*

IS.	COMPL.	TRYP.	RÉSULTAT 40 min. à 37°.	INJECTION à souris.	DATE							
					9 mars	10 mars	11 mars	13 mars	14 mars	15 mars	16 mars	17 mars
0,1	0,3	1 g.	Compl.	1	0	0	0	0	0	r.	n. r.	+
0,01	»	»	Compl.	2	0	0	n. r.	»	»	»	»	»
0,002	»	»	Compl.	3	0	tr.	Essais R ₄ .	t. n. +	»	»	»	»
0,001	»	»	Part.	4	n. r.	n. r.	+	»	»	»	»	»

Essai de la résistance de la race Rat-R₁ (0,01 IS).

IS.	COMPL.	TRYP.	TRYPANOSOMES			
			Tube.	Rat-R ₄ .	Tube.	Nagana.
0,1	0,3	1 goutte.	1	Compl.	5	Compl.
0,01	»	»	2	Trace.	6	Compl.
0,002	»	»	3	0	7	Compl.
0,001	»	»	4	0	8	Partiel.

Ce tableau montre que la race *Rat-R₁* n'est que partiellement

résistante. On fait un nouveau passage sur la souris; le contenu des tubes 1-2 et 3 est injecté à trois souris, le 14 mars.

	12 mars.	13 mars.	14 mars.	15 mars.
Souris 1. . .	0	t. r.	n. r.	Essais = Race Rat-R ₂ .
Souris 2. . .	Rares.	n.	n.	+
Souris 3. . .	Rares.	n.	+	

Essai de la résistance de la race Rat-R₂.

IS.	COMPL.	TRYP.	TRYPANOSOMES	
			Rat-R ₂ .	Nagana.
—	—	—	—	—
0,3	0,3	1 goutte.	0	Compl.
0,1	0,3	1 goutte.	0	Compl.

Il en résulte que la race Rat-R₂ a acquis une résistance solide vis-à-vis des trypanolysines contenues dans l'immun-sérum du rat.

IV

CRÉATION DE LA RACE RÉSISTANTE AUX TRYPANOLYSINES DE LA POULE (*Race Poule-R*).

1. *Préparation du sérum.* — Deux poules reçoivent dans la circulation générale, 1 cent. cube d'une émulsion épaisse de trypanolysine du Nagana, tués par un chauffage à 56 degrés, pendant trois minutes (1).

Poule 1 { 1^{re} injection le 9 mars; 2^e injection le 18 mars.
Poule 2 { Saignées le 26 mars.

Essai du sérum (chauffage préalable à 56 degrés pendant trente minutes).

IS.	COMPL.	TRYP.	RÉSULTAT APRÈS 30 MINUTES à 37 degrés.
			—
0,1	0,3	1 goutte.	Complet.
0,01	»	»	Presque complet.
0,005	»	»	Partiel.
0,0025	»	»	0
0,002	»	»	0

(1) Ces trypanosomes sont isolés par notre procédé de la centrifugation, en tubes étroits, du sang de rats infectés (sang pris dans le cœur et la veine sus-hépatique, défibriné, dilué au tiers avec de l'eau salée, puis centrifugé; on recueille la couche blanche de trypanosomes).

2. Préparation de la race résistante Poule-R.

On dispose l'expérience comme pour la préparation des autres races résistantes (Cobaye, Lapin, etc.).

Essai de la race Poule-R.

IS.	COMPL.	TRYP.	TRYPANOSOMES	
			Poule-R.	Nagana.
—	—	—	—	—
0,2	0,3	1 goutte.	0	Compl.
0,1	»	»	0	Compl.
0,02	»	»	0	Compl.
0,005	»	»	0	—
0,0025	»	»	0	—

Il en résulte que la race POULE-R est réfractaire aux trypanolysines contenues dans l'immun-sérum de poule.

Il s'agit bien d'une race résistante aux anticorps spécifiques qui apparaissent dans le sérum des poules préparées par des injections de trypanosomes morts. En effet, le sérum de poule normale n'exerce aucune action trypanocide à l'égard des tryp. du Nagana, et, d'un autre côté, ces flagellés, mis en présence d'un tel sérum de poule normale, n'acquièrent aucun état réfractaire vis-à-vis des anticorps trypanocides du cobaye. Ils se comportent, à ce point de vue, comme la race Nagana-souche. C'est ce qui résulte des expériences suivantes :

a) On mélange 0 cent. cube 5 de sérum frais de poule normale à deux gouttes de tryp. du Nagana (souche) et on porte le tout pendant quarante-cinq minutes à 37 degrés. Aucune action manifeste. Le mélange est injecté à une souris, laquelle s'infecte; ses trypanosomes se montrent tout aussi sensibles que le Nagana originaire à l'égard des trypanolysines spécifiques de la poule.

b) Les mêmes trypanosomes, que nous appellerons Tryp. Poule-N, par opposition aux flagellés résistants contre l'immun-sérum de poule, Tryp. Poule-R, sont injectés à un cobaye n° 55, ce qui permet la préparation d'anticorps contre ces trypanosomes. En faisant agir ce sérum sur les tryp. Poule-R, Poule-N et Nagana, nous avons pu établir que la race Poule-N est différente de la race Poule-R et identique à la race Nagana-souche. D'un autre côté, en nous servant d'un sérum de cobaye (n° 44) anti-Poule-R, nous sommes arrivés aux mêmes résultats.

1. Sérum anti-Poule-N (Cobaye n° 55).

IS.	COMPL.	TRYP.	TRYPANOSOMES		
			Nagana.	Poule-R.	Poule-N.
—	—	—	—	—	—
0,1	0,4	1 goutte.	Presque compl.	0	Compl.
0,01	0,4	1 goutte.	»	0	Compl.

2. *Sérum anti-Poule-R* (Cobaye n° 44).

IS.	COMPL.	TRYP.	TRYPANOSOMES		
			Nagana.	Poule-R.	Poule-N.
—	—	—	—	—	—
0,4	0,4	1 goutte.	0	Partiel.	0
0,01	0,4	1 goutte.	0	0	0

Ces expériences montrent bien que *notre race Poule-R est réfractaire aux anticorps trypanolytiques spécifiques fabriqués par les poules vaccinées avec des flagellés tués par la chaleur.*

V

FIXITÉ DES RACES RÉSISTANTES.

Dans nos travaux antérieurs sur le mécanisme de la création des races de trypanosomes résistantes aux anticorps, nous avons insisté sur le fait que ces races, rendues réfractaires par le procédé dont nous venons d'indiquer les détails, conservent pendant très longtemps leurs propriétés acquises, malgré les nombreux passages qu'on leur fait subir sur la souris. Cette fois-ci, nous avons voulu également nous assurer de cette invariabilité de nos races au point de vue de leur résistance aux anticorps et nous avons pratiqué trois essais ; ils ont tous fourni des résultats concordants, comme le montrent les protocoles suivants :

1^o *Première série de races résistantes Cobaye-R, Lapin-R, Rat-R et Poule-R.* — Ces races ont servi aux expériences que nous avons faites de mars à juillet 1912.

Race Cobaye-R a été créée le 12 mars.

Race Lapin-R a été créée le 12 mars.

Race Rat-R a été créée le 14 mars.

Race Poule-R a été créée le 30 mars.

Premier essai le 7 mai.

IS.	COMPL.	TRYP.	LAP.-R	COB.-R	RAT-R	POULE-R
0,4	0,3	1 goutte.	0	0	0	0
0,2	0,3	1 goutte.	0	0	0	0
Nombre de jours			56	56	54	38
Nombre des passages.			28	28	27	19

Deuxième essai le 15 mai.

IS.	COMPL.	TRYP.	LAP-R.	COB.-R	RAT-R	POULE-R
0,1	0,3	1 goutte.	0	0	0	0
0,02	0,3	1 goutte.	0	0	0	0
Nombre de jours			64	64	62	46
Nombre des passages.			32	32	31	23

2° *Deuxième série de races résistantes.* — Ces races, créées le 15 novembre 1912, nous ont servi à nos expériences faites de novembre 1912 à février 1913. Elles sont éprouvées le 10 janvier, soit cinquante-six jours après leur création et après vingt-huit passages sur la souris. Elles se sont montrées toutes résistantes aux anticorps correspondants.

On peut donc conclure de ces données que les races de trypanosomes *Nagana*, rendues réfractaires aux trypanolysines du cobaye, du lapin, du rat et de la poule, par action de ces anticorps sur les flagellés in vitro, conservent leur résistance après un très grand nombre de passage par la souris.

VI

ACTION HOMOLOGUE ET CROISÉE DES ANTICORPS TRYPANOLYTIQUES DE COBAYE, LAPIN, RAT ET POULE SUR LES RACES RÉFRACTAIRES PRÉPARÉES A L'AIDE DE CES ANTICORPS.

Une fois en possession de nos races réfractaires aux anticorps, nous avons recherché quelles relations existaient entre elles. L'examen morphologique ne permettant aucune déduction, nous avons soumis chacune de ces races à l'action des trypanolysines qui ont servi à la préparation des autres; en d'autres termes, nous avons fait agir chaque anticorps : cobaye, lapin, rat et poule sur la race correspondante et aussi sur les trois autres (1).

(1) Y compris le *Nagana-souche*.

Les nombreuses expériences que nous avons réalisées dans cette voie ont toutes fourni des résultats concordants, comme il résulte des protocoles suivants :

1. *Expérience du 25 mars.* — Action des trypanolysines du rat (*IS.-Rat*) sur les trypanosomes *Lapin-R* et *Nagana*.

IS.	COMPL.	TRYP.	TRYPANOSOMES	
			Lapin-R.	Nagana.
—	—	—	—	—
0,1	0,2	1 goutte.	0	<i>Compl.</i>
0,01	»	»	0	<i>Compl.</i>
0,002	»	»	0	<i>Partiel</i>
0,001	»	»	0	<i>Trace</i>

Les try. *Lapin-R* résistent à l'*IS. de Rat*.

2. *Expérience du 28 mars.* — Action de l'*IS.-Cobaye* et de l'*IS.-Lapin* sur les try. *Cobaye-R*.

IS.	COMPL.	TRYP.	IMMUN-SÉRUM	
			Cobaya.	Lapin.
—	—	—	—	—
0,2	0,3	1 goutte.	0	0
0,1	»	»	0	0
0,02	»	»	0	0
0,01	»	»	0	0
0,005	»	»	0	0

Les try. *Cobaye-R* résistent à l'*IS.-Cobaye* et à l'*IS.-Lapin*.

3. *Expérience du 2 avril.* — Action de l'*IS-Poule* sur les trypanosomes *Poule-R*, *Lapin-R*, *Cobaye-R*, *Rat-R* et *Nagana-souche*; trypanolyse avec les sérums homologues.

ACTION	IS.	COMPL.	TRYP.	TRYPANOSOMES				
	Poule.			Poule-R.	Lap.-R.	Cob.-R.	Rat-R.	Nagana.
Croisée.	0,2	0,2	1 g.	0	0	0	0	<i>Compl.</i>
	0,1	»	1 g.	»	0	0	0	<i>Pr. compl.</i>
	0,01	»	1 g.	»	0	0	0	<i>Partiel.</i>
Homologue.	<i>Lap.</i> 0,2	0,2	1 g.	»	0	—	—	<i>Pr. compl.</i>
	<i>Cob.</i> 0,2	»	1 g.	»	—	0	—	<i>Compl.</i>
	<i>Rat</i> 0,2	»	1 g.	»	—	—	0	<i>Compl.</i>

Les try. *Poule-R*, *Cobaye-R*, *Lapin-R* et *Rat-R* résistent aux anticorps de poule (*IS.-Poule*).

4. *Expérience du 2 avril.* — Action de l'IS. de Lapin et de Rat sur les tryp. Poule-R.

IS.	COMPL.	TRYP.	IMMUN-SÉRUM	
			Lapin.	Rat.
—	—	—	—	—
0,2	0,2	1 goutte.	0	0
0,1	»	»	0	0
0,02	»	»	0	0
0,01	»	»	0	0
0,005	»	»	0	0

Les trypanosomes Poule-R résistent aux anticorps de la poule (IS.-Poule) et du Rat (IS.-Rat).

5. *Expérience du 16 avril.* — Action de l'IS. de lapin sur les trypanosomes Cobaye-R., Lapin-R., Rat-R., Poule-R. et Nagana-souche.

IS.	COMPL.	TRYP.	TRYPANOSOMES				
			Cob.-R.	Poule-R.	Rat-R.	Lap.-R.	Nagana.
0,1	0,3	1 goutte.	0	0	0	0	Compl.
0,02	0,3	»	0	0	0	0	Compl.
0,01	0,3	»	0	0	0	0	Pr. Compl.
0,005	0,3	»	0	0	0	0	»
0,0025	0,3	»	0	0	0	0	»

Les trypanosomes Cobaye-R, Lapin-R, Rat-R et Poule-R résistent aux trypanolysines du Lapin (IS.-Lapin).

6. *Expérience du 20 avril.* — Action de l'IS.-Cobaye sur les trypanosomes Lapin-R, Rat-R, Poule-R et Nagana-souche.

IS.	COMPL.	TRYP.	TRYPANOSOMES			
			Lap.-R.	Rat-R.	Poule-R.	Nagana.
0,1	0,3	1 goutte.	0	0	0	Compl.
0,02	»	»	0	0	0	Trace.
0,01	»	»	0	0	0	»
0,005	»	»	0	0	0	»
0,0025	»	»	0	0	0	»

Nous résumons dans le tableau ci-dessous les résultats

fournis par ces expériences et par d'autres essais dont nous renonçons à exposer les détails.

IS. CORAYE		IS. LAPIN		IS. RAT.		IS. POULE	
Trypanosomes.	Résultats.	Trypanosomes.	Résultats.	Trypanosomes.	Résultats.	Trypanosomes.	Résultats.
Nagana	+	Nagana	+	Nagana	+	Nagana	+
Lap.-R.	0	Lap.-R.	0	Lap.-R.	0	Lap.-R.	0
Lap.-R.	0	Cob.-R.	0	Lap.-R.	0	Cob.-R.	0
Cob.-R.	0	Cob.-R.	0	Cob.-R.	0	Rat.-R.	0
Rat.-R.	0	Rat.-R.	0	Rat.-R.	0	Poule-R.	0
Rat.-R.	0	Poule-R.	0	Poule-R.	0	"	"
"	"	Poule-R.	0	Poule-R.	0	"	"

Ce tableau permet de formuler la conclusion suivante : Une race de trypanosomes, rendue réfractaire à l'égard des trypanolysines élaborées par une des quatre espèces animales avec lesquelles nous avons expérimenté, l'est également vis-à-vis des anticorps trypanocides fabriqués par les trois autres espèces. C'est là une conclusion qui concorde avec les faits observés par Mesnil et Brimont d'une part, par Braun et Teichmann d'autre part. Les premiers ont vu, en effet, que les flagellés résistants aux anticorps d'un bouc vacciné, l'étaient aussi, quoique d'une façon moins accentuée, aux anticorps préventifs d'un chien réfractaire. De leur côté, Braun et Teichmann ont constaté que les trypanosomes qui résistaient aux trypanolysines du lapin se montraient également vaccinés à l'égard de lysines de la souris et du rat.

Que devons-nous conclure de cette première série de recherches, au sujet des rapports qui existent entre les anticorps produits par des espèces animales différentes, soumises à l'influence d'un même antigène? Nous avons dit, au commencement de ce travail, que chacune des races de trypanosomes réfractaires créées par nous doit être considérée comme un miroir qui reproduit les caractères des anticorps ayant servi à la préparation de ces races. Les rapports qui les relient représentent fidèlement ceux qui existent entre leurs anticorps res-

pectifs. Or, nous voyons qu'au point de vue de la façon dont elles se comportent à l'égard de ces anticorps, aucune différence manifeste ne saurait être révélée entre ces races réfractaires : elles résistent aux anticorps, quelle que soit l'espèce animale qui a fabriqué ces anticorps. Devons-nous conclure de là que, puisque les races de flagellés résistants paraissent identiques par rapport à l'indicateur utilisé, les anticorps : *lapin*, *cobaye*, *rat* et *poule* le sont également ? Nous ne le pensons pas. En effet, il se peut que la résistance aux sérums trypanocides, homologues et hétérologues, si constante chez nos parasites réfractaires, ne soit qu'un caractère commun parmi d'autres caractères différentiels qui restent cachés parce que l'indicateur est incapable de les révéler. Le schéma suivant rend compte de cette hypothèse :

Désignons par *R* la résistance aux anticorps homologues et hétérologues et par *a*, *b*, *c*, etc., les autres caractères différentiels. Nos quatre races pourront être représentées schématiquement comme il suit :

<i>Race Cob.-R</i>	$R + a + d$
<i>Race Lap.-R</i>	$R + b + d$
<i>Race Rat-R</i>	$R + c + a$
<i>Race Poule-R</i>	$R + e + b$

Disposons-nous d'un autre moyen capable de mettre en évidence chez nos quatre races résistantes ces caractères différentiels hypothétiques ? L'expérience répond affirmativement. En effet, lorsqu'on désire connaître les affinités qui existent entre les divers échantillons d'une bactérie agglutinogène donnée, on fait appel aux agglutinines spécifiques, dont l'emploi permet la création de groupes de bactéries de la même espèce (agglutination de groupes). Nous avons appliqué le même procédé à nos races résistantes et nous avons essayé de saisir leurs affinités réciproques en nous servant d'immun-sérums spécifiques, préparés avec chacune de ces races. A l'aide de ces sérums, nous avons réalisé toutes les combinaisons homologues et croisées possibles. Précisons :

Nous injectons à des cobayes la *race Cobaye-R* par exemple ; au moment de la crise, on saigne les animaux et on obtient ainsi un *anti-sérum contre la race Cobaye-R* (*IS. anti-Cobaye-R*). En faisant agir ce sérum sur la *race Cobaye-R* et aussi sur les trois

autres races *Lapin-R*, *Rat-R* et *Poule-R*, nous déterminerons les affinités qui existent entre ces races; en d'autres termes, nous révélerons par cet indicateur les caractères différentiels dont il a été question plus haut.

Nous avons réalisé de nombreuses expériences de ce genre dont nous exposons les détails ci-dessous.

VII

LES AFFINITÉS ENTRE LES QUATRE RACES RÉSISTANTES DE TRYPANOSOMES.

A. — Affinités de la race *Cobaye-R*.

I. — On se sert de la race *Cobaye-R*₁₀ pour infecter trois cobayes n^{os} 84, 85 et 86. Voici la marche de l'infection, l'apparition de la crise et le moment de la saignée (infection le 8 juillet) :

	10 juillet.	11 juillet.	12 juillet.	13 juillet.	14 juillet.	15 juillet.	
	—	—	—	—	—	—	
Cob. n ^o 84.	n. r.	n. r.	n.	n. r.	0	0	saigné.
Cob. n ^o 85.	n. r.	n.	n.	r.	t. tr.	0	saigné.
Cob. n ^o 86.	n.	n.	tn.	tn.	0	0	saigné.

Voici, d'autre part, la façon dont ces trois sérums agissent sur le Nagana-souche et nos quatre races résistantes :

SÉRUM de cob.	QUANTITÉ de sérum inactivé.	COMPL.	RACES				
			Nagana.	Cob.-R.	Lap.-R.	Rat-R.	Poule R.
N ^o 84.	0,1 0,01	0,3	0 0	C. C.	C. C.	C. C.	0 0
N ^o 85.	0,1 0,01	0,3	0 0	C. C.	C. C.	C. C.	0 0
N ^o 86.	0,1 0,01	0,3	0 0	C. C.	C. C.	C. C.	0 0

Cette expérience montre que la race *Cobaye-R* offre des affinités communes avec les races *Lapin-R* et *Rat-R* et qu'elle

paraît entièrement indépendante des races Nagana-souche et Poule-R.

II. — Une nouvelle race Cobaye-R, préparée le 15 novembre, sert à infecter quatre cobayes n^{os} 31, 32, 33 et 34. Marche de l'infection et saignée (infection le 12 décembre) :

	4 décembre.	6 décembre.	9 décembre.	10 décembre.
Cob. 31 . .	n. r.	n. r.	0	Saigné.
Cob. 32 . .	t. r.	t. r.	0	Saigné.
Cob. 33 . .	ass. n.	n.	0	Saigné.
Cob. 34 . .	r.	n.	0	Saigné.

Nous avons examiné comment agissent ces sérums sur le [Nagana-souche et les quatre races résistantes :

SÉRUM de cobaye.	QUANTITÉ de sérum inactivé.	COMPL.	RACES				
			Nagana.	Cob.-R.	Lap.-R.	Rat-R.	Poule-R.
Cob. 31	0,1 0,01	0,3	0 0	c. c.	tr. tr.	p. c. p. c.	0 0
Cob. 32	0,1 0,01	0,3	0 0	c. c.	tr. tr.	part. p. c.	0 0
Cob. 33	0,1 0,01	0,3	0 0	c. c.	part. tr.	c. part.	0 0
Cob. 34	0,1 0,01	0,3	0 0	c. c.	part. part.	c. p. c.	0 0

Cette seconde expérience, conforme à celle qui vient d'être décrite, montre que *la race Cobaye-R a des affinités avec les races Lapin-R et Rat-R, tout en étant indépendante des races Nagana-souche et Poule-R.*

III. — Dans cette dernière expérience, nous nous sommes servis de la même race [Cobaye-R pour infecter nos cobayes. L'injection ayant eu lieu le 11 janvier 1913, *cette race a donc été entretenue par des passages réguliers sur la souris pendant près de DEUX MOIS.* Cette expérience nous renseigne ainsi sur

les modifications possibles subies par cette race Cobaye-R au point de vue de ses affinités, au cours des nombreux passages qu'elle a subis dans l'organisme de la souris.

Infection des cobayes, crise et saignée :

	13 janvier.	16 janvier.	18 janvier.	19 janvier.
Cobaye n° 61. . .	0	n.	0	Saigné.
Cobaye n° 62. . .	r.	n.	0	Saigné.
Cobaye n° 63. . .	r.	n.	0	Saigné.
Cobaye n° 64. . .	n. r.	n.	0	Saigné.

Mode d'action des quatre sérums sur les races Nagana-souche et résistantes :

SÉRUM de cobaye.	QUANTITÉ de sérum.	COMPL.	RACES				
			Nagana.	Cob.-R.	Lap.-R.	Rat.-R.	Poule-R.
Cob. 61.	0,1	0,3	0	c.	0	p. c.	0
Cob. 62.	0,1	0,3	0	c.	0	c.	0
Cob. 63.	0,1	0,3	0	c.	0	c.	0
Cob. 64.	0,1	0,3	0	c.	0	c.	0

Il résulte de ce tableau que la race Cobaye-R, examinée à deux mois d'intervalle, n'offre d'affinités marquées qu'avec la race Rat-R. Elle a donc perdu au cours de ses passages sur la souris ses affinités avec la race Lapin-R. Nous avons constaté le même phénomène lorsque nous avons examiné par le même procédé les races Lapin-R et Rat-R, comme nous le montrerons plus loin.

En résumé, l'étude des affinités entre les races Cobaye-R et les autres races, y compris le Nagana-souche, met en évidence les données suivantes :

1° La race Cobaye-R, résultant de l'action exercée *in vitro* par les trypanolysines du cobaye sur le Nagana-souche, est

devenue entièrement différente de la race d'origine (*Nagana*), au point de vue de l'action croisée des anticorps (1).

2° La race *Cobaye-R* offre des affinités marquées avec les deux races résistantes *Rat-R* et *Lapin-R*; toutefois, ses rapports avec cette dernière race *Lapin-R* sont moins intimes qu'avec la race *Rat-R*, ainsi qu'il résulte de la faible action des sérums sur la race *Lapin-R* (voy. tableaux).

3° Après un certain nombre de passages sur la souris, la race *Cobaye-R* a perdu complètement ses faibles affinités avec la race *Lapin-R*, tout en conservant celle qu'elle offrait avec la race *Rat-R*.

4° Enfin la race *Cobaye-R* apparaît comme entièrement différente de la race *Poule-R* au point de vue de l'action croisée des trypanolysines.

Les chiffres suivants rendent compte des rapports entre la race *Cobaye-R* et les autres races :

Onze sérums, préparés avec les races *Cobaye-R*₁₀ et *Cobaye-R*.

Affinités avec <i>Cobaye-R</i>	11 sur 41
Affinités avec <i>Rat-R</i>	11 sur 41
Affinités avec <i>Lapin-R</i> (faibles)	8 sur 41
Affinités avec <i>Poule-R</i>	0 sur 41
Affinités avec <i>Nagana-souche</i>	0 sur 41

B. — Affinités de la race *Rat-R*.

I. — Dans une première expérience, nous nous sommes servis de la race *Rat-R* pour infecter un cobaye n° 67, chez lequel la trypanosomiase a évolué comme suit.

	19 juin.	21 juin.	22 juin.	24 juin.	25 juin.
Cob. n° 67. .	n. r.	n.	n. r.	0	Saigné.

On étudie l'action de ce sérum sur les quatre races :

COBAYE	dosé de sé	COMPL.	RACES				
			Nagana.	Rat-R.	Cob.-R.	Lap.-R.	Poule-R.
N° 67.	0,1	0,3	0	p. c.	c.	part.	0
	0,01	0,3	0	part.	c.	p. c.	0

(1) Une constatation analogue a été faite antérieurement par Braun et Teichmann (*loc. cit.*).

Ce tableau montre que la race Rat-R offre des affinités avec les races Cobaye-R et Lapin-R, tout en étant différente des races Nagana-souche et Poule-R.

II. — Nouvelle race Rat-R¹, préparée le 15 novembre. Cette race sert à infecter les cobayes nos 39, 40 et 41. Voici la marche de l'infection et le moment de la saignée. Infection le 3 décembre.

	4 décembre.	6 décembre.	9 décembre.	10 décembre.	11 décembre.
Cob. n° 39 .	0	r.	n. r.	0	Saigné.
Cob. n° 40 .	ass. n.	t. n.	t. r.	0	Saigné.
Cob. n° 41 .	n.	n.	t. r.	0	Saigné.

Les trois sérums servent à préciser les affinités entre nos races résistantes.

COBAYES	QUANTITÉ de sérum.	COMPL.	RACES				
			Nagana.	Rat-R.	Cob.-R.	Lap.-R.	Poule-R.
N° 39.	0,1	0,3	0	c.	c.	tr.	0
	0,01	0,3	0	c.	c.	tr.	0
N° 40.	0,1	0,3	0	c.	c.	tr.	0
	0,01	0,3	0	c.	c.	tr.	0
N° 41.	0,1	0,3	0	c.	c.	tr.	0
	0,01	0,3	0	c.	c.	tr.	0

Mêmes conclusions que dans l'expérience précédente. A retenir la faible affinité entre la race Rat-R et Lapin-R (trace d'action trypanolytique).

III. — On se sert de la même race Rat-R que dans l'expérience II. L'examen a été pratiqué le 11 janvier 1913, c'est-à-dire deux mois environ depuis la préparation de cette race; pendant cet intervalle, la race a été entretenue par des passages réguliers sur la souris. Quatre cobayes nos 65, 66, 67 et 68 ont été infectés le 11 janvier; voici l'évolution de l'infection:

	13 janvier.	16 janvier.	18 janvier.	
Cob. n° 65	r.	tr.	r.	Saigné.
Cob. n° 66	t. r.	n. r.	0	Saigné.
Cob. n° 67	t. r.	n.	0	Saigné.
Cob. n° 68	r.	n.	0	Saigné.

Les quatre sérums servent à préciser les affinités entre nos races :

COBAYES	QUANTITÉ de sérum.	COMPL.	RACES				
			Nagana.	Rat-R.	Cob.-R.	Lap.-R.	Poule.-R.
N° 65.	0,4	0,3	0	p. c.	c.	0	0
N° 66.	0,4	0,3	0	c.	c.	0	0
N° 67.	0,4	0,3	0	c.	c.	0	0
N° 68.	0,1	0,3	0	c.	c.	0	0

Cette expérience montre que la race Rat-R, examinée environ deux mois après sa préparation, n'offre des affinités qu'avec la race Cobaye-R. Or, nous venons de voir que cette race, étudiée au même point de vue, quelque temps auparavant, possédait, en plus, des affinités, il est vrai faibles, avec la race Lapin-R. Il en résulte qu'après un certain nombre de passages sur la souris, cette race a perdu ses faibles affinités avec la race Lapin-R et n'a conservé que celles qui la rapprochent de la race Cobaye-R.

En résumé, *la race Rat-R nous apparaît comme très rapprochée de la race Cobaye-R, en ce sens qu'elle présente des caractères communs avec les races Cobaye-R et Lapin-R*; qu'au point de vue de l'action croisée des trypanolysines, *elle est indépendante des races Nagana-souche et Poule-R*. Les chiffres suivants rendent compte des relations entre cette race Rat-R et les autres races :

Huit sérums préparés avec la race Rat-R.

<i>Affinités avec la race Rat-R</i>	<i>8 sur 8</i>
<i>Affinités avec la race Cobaye-R</i>	<i>8 sur 8</i>
<i>Affinités avec la race Lapin-R</i>	<i>4 sur 8</i>
<i>Affinités avec la race Poule-R</i>	<i>0 sur 8</i>
<i>Affinités avec la race Nagana-souche</i>	<i>0 sur 8</i>

C. — *Affinités de la race Lapin-R.*

I. — On se sert de la race Lapin-R₁₀ pour infecter 3 cobayes n^{os} 64, 65 et 66; voici la marche de l'infection et le moment de la saignée. Infection le 17 juin.

	19 juin.	21 juin.	22 juin.	25 juin.
Cob. 64	r.	r.	0	Saigné.
Cob. 65	n. r.	n. r.	0	Saigné.
Cob. 66	n.	r.	0	Saigné.

Les trois sérums servent à préciser les affinités entre la race Lapin-R et les autres races.

COBAYES	QUANTITÉ de sérum.	COMPL.	RACES				
			Nagana.	Lap.-R.	Cob.-R.	Rat.-R.	Poule-R.
N ^o 64.	0,1 0,01	0,3	0 0	c. c.	c. c.	c. part.	0 0
N ^o 65.	0,1 0,01	0,3	0 0	c. c.	c. c.	c. part.	0 0
N ^o 66.	0,1 0,01	0,3	0 0	c. c.	c. c.	c. c.	0 0

II. — Cette expérience, faite avec une autre race *Lapin R_m*, préparée le 15 nov., a été disposée comme la précédente. Infection des cobayes le 3 déc.

	4 décembre.	6 décembre.	9 décembre.	10 décembre.
Cob. 35. . .	ass. n.	n.	0	Saigné.
Cob. 37. . .	t. r.	n.	0	Saigné.
Cob. 48. . .	t. n.	t. n.	t. r.	Saigné.

Les trois sérums servent à préciser les rapports entre la race Lapin-R et les autres.

COBAYES	IS. inactivé.	COMPL.	RACES				
			Nagana.	Lap.-R.	Cob.-R.	Rat.-R.	Poule-R.
N ^o 35.	0,1 0,01	0,3	0 0	c. part.	p. c. p. c.	c. p. c.	0 0
N ^o 37.	0,1 0,01	0,3	0 0	p. c. p. c.	c. c.	c. p. c.	0 0
N ^o 38.	0,1 0,01	0,3	0 0	p. c. part.	c. p. c.	c. p. c.	0 0

III. — Du 15 décembre, date de sa préparation, jusqu'au 11 janvier 1913, la même race Lapin-R_m est entretenue par passages réguliers sur la souris. Le 11 janvier, on répète l'expérience précédente, et on infecte trois cobayes n^{os} 57, 58 et 59.

Infection de cobayes le 11 janvier.

	13 janvier.	10 janvier.	18 janvier.	19 janvier.
Cob. 57 . . .	r.	n.	0	Saigné.
Cob. 58 . . .	0	n.	0	Saigné.
Cob. 59 . . .	n. r.	t. n.	0	Saigné.

Les trois sérums servent à préciser les rapports entre la race Lapin-R et les autres.

COBAYES	IS. inactivé.	COMPL.	RACES				
			Nagana.	Lap. R.	Cob.-R.	Rat.-R.	Poule-R.
N ^o 57.	0,1	0,3	0	c.	0	0	0
N ^o 58.	0,1	0,3	0	c.	0	0	0
N ^o 59.	0,1	0,3	0	c.	part.	part.	0

Voici les conclusions qui se dégagent de ces trois expériences :

1^o La race Lapin-R, préparée en faisant agir les trypanolysines du lapin sur le Nagana-souche, est devenue entièrement différente, au point de vue de sa façon de réagir aux anticorps in vitro, de cette race Nagana-souche.

2^o La race Lapin-R offre des affinités marquées avec les deux races résistantes Cobaye-R et Rat-R.

3^o Après un certain nombre de passages sur la souris, la race Lapin-R se purifie, en ce sens qu'elle perd ses affinités secondaires avec les races Cobaye-R et Rat-R (sérums 58 et 59).

4^o La race Lapin-R apparaît comme entièrement différente de la race Poule-R, au point de vue de l'action croisée des trypanolysines.

5^o Enfin, cette action croisée des sérums trypanolytiques montre qu'en ce qui concerne ses affinités, la race Lapin-R est

identique avec les races Cobaye-R et Rat-R et totalement différente de la race Poule-R.

Les chiffres suivants rendent compte des relations entre la race Lapin-R et les autres :

Affinités avec la race Lapin-R 9 sur 9
Affinités avec la race Cobaye-R 7 sur 9
Affinités avec la race Rat-R 7 sur 9
Affinités avec la race Poule-R 0 sur 9
Affinités avec la race Nagana-souche 0 sur 9

D. — Affinités de la race Poule-R.

I. — Notre première race Poule-R sert à infecter deux cobayes n^{os} 36 et 37. Voici la marche de l'infection et le moment de la saignée.

Infection le 3 juin.

	5 juin.	7 juin.	9 juin.	10 juin.	12 juin.
Cob. 36. . .	n. r.	t. n.	r.	0	Saigné.
Cob. 37. . .	n.	t. n.	r.	t. r.	Saigné.

Les deux sérums servent à préciser les affinités entre la race Poule-R et les autres races :

COBAYES	IS. inactivé.	COMPL.	RACES				
			Nagana.	Poule-R.	Cob.-R.	Lap.-R.	Rat-R.
N ^o 36.	0,1	0,3	0	c.	0	0	0
	0,01		0	c.	0	0	0
N ^o 37.	0,1	0,3	0	c.	0	0	0
	0,01		0	c.	0	0	0
	0,005		0	c.	0	0	0

II. — Le 15 juin, on infecte deux cobayes n^{os} 52 et 53, et un lapin n^o 54, avec la même race Poule-R. Voici la marche de l'infection et le moment de la saignée :

	17 juin.	19 juin.	21 juin.	22 juin.	22 juin.
Cob. 52.	r.	n.	0	r.	Saigné.
Cob. 53.	t. r.	n.	n.	0	Saigné.
Lap. 54.	n. r.	0	0	0	Saigné.

Les trois sérums servent à déterminer les relations entre la race Poule-R et les autres.

COBAYES	IS. inactivé.	COMPL.	RACES				
			Nagana.	Poule-R.	Cob.-R.	Lap.-R.	Rat.-R.
N° 52.	0,1 0,01	0,3	0 0	c. c.	0 0	0 0	0 0
N° 53.	0,1 0,01	0,3	0 0	c. c.	0 0	0 0	0 0
N° 54.	0,1 0,01	0,3	0 0	c. c.	0 0	0 0	0 0

III. — Dans cette expérience, nous nous sommes servis d'une nouvelle race Poule-R_b préparée le 21 novembre. Deux cobayes n°s 44 et 46 sont infectés le 4 décembre.

	6 décembre.	9 décembre.	10 décembre.	11 décembre.	12 décembre.	
Cob. 44.	t. r.	t. n.	n.	n.	0	saigné.
Cob. 46.	t. r.	n.	n. r.	0	0	saigné.

Action des sérums 44 et 46 sur les races résistantes et le Nagana-souche.

COBAYES	IS. inactivé.	COMPL.	RACES				
			Nagana.	Poule-R.	Cob.-R.	Lap.-R.	Rat.-R.
N° 44.	0,1 0,01	0,3	0 0	p. c. part.	0 0	0 0	0 0
N° 46.	0,1 0,01	0,3	0 0	p. c. 0	0 0	0 0	0 0

IV. — Même race, inoculée aux cobayes 71 et 72, le 11 janvier 1913, après un certain nombre de passages sur souris. Marche de l'infection chez les cobayes et moment de la saignée.

	13 janvier.	16 janvier.	18 janvier.	18 janvier.
Cob. 71. . . .	0	r.	0	Saigné.
Cob. 72. . . .	0	n. r.	0	Saigné.

Le 23 janvier, on essaye l'action des deux sérums sur les races résistantes et le Nagana-souche.

COBAYE	IS. inactivé.	COMPL.	RACES				
			Nagana.	Poule-R.	Cob.-R.	Lap.-R.	Rat-R.
N° 71.	0,4	0,3	0	part.	0	0	0
N° 72.	0,4	0,3	0	p. c.	0	0	0

Les quatre expériences précédentes sont toutes concluantes pour montrer que *la race Poule-R occupe une place à part parmi les quatre races résistantes préparées par nous. En effet, au point de vue de l'action croisée des trypanolysines, cette race Poule-R ne montre aucune affinité, ni avec le Nagana-souche, ni avec les autres races Cobaye-R, Lapin-R et Rat-R.*

Les chiffres suivants rendent compte de ce fait :

Affinités avec la race <i>Poule-R</i>	9 fois sur 9
Affinités avec la race <i>Cobaye-R</i>	0 fois sur 9
Affinités avec la race <i>Lapin-R</i>	0 fois sur 9
Affinités avec la race <i>Rat-R</i>	0 fois sur 9
Affinités avec la race <i>Nagana-souche</i> . .	0 fois sur 9

VIII

CONCLUSIONS.

Nous venons d'exposer nos résultats concernant les relations entre les quatre races résistantes préparées à l'aide d'anticorps trypanolytiques fabriqués par quatre espèces animales (Lapin, Cobaye, Rat et Poule), soumises à l'influence d'un même antigène.

Les schémas suivants (p. 952), qui résument ces résultats, faciliteront leur interprétation et permettront d'en déduire les conclusions.

Chaque ligne horizontale représente l'action exercée par un sérum donné sur les quatre races; les lignes verticales indiquent l'existence d'une trypanolyse positive sur la race correspondante, trypanolyse dont l'intensité est mesurée approximativement par la hauteur de la ligne.

De l'ensemble de ces données, il résulte que nos quatre races résistantes sont loin de se comporter de la même façon, au point de vue de leurs affinités réciproques, appréciées d'après l'action croisée des anticorps trypanolytiques. *Les trois races Lapin-R, Cobaye-R et Rat-R, préparées avec des immun-sérums de mammifères, font un groupe à part, nettement séparé de la race Poule-R, obtenue en faisant agir sur le Nagana-souche les trypanolysines de l'espèce ovipare poule.*

En effet, tandis que les trois premières races sont très rapprochées, en ce sens qu'un immun-sérum fabriqué par le cobaye contre l'une d'elles agit sur les deux autres, par contre *la race Poule-R se montre complètement indépendante*; elle est insensible aux anticorps dirigés contre les races Cobaye-R, Lapin-R et Rat-R, et d'un autre côté, le sérum anti-Poule-R n'agit en aucune façon sur les autres races résistantes.

Nous avons dit, au commencement de ce travail, que les affinités entre les diverses races résistantes obtenues à l'aide d'anticorps provenant d'espèces animales plus ou moins éloignées, nous renseignent sur les rapports entre ces anticorps. Or, les recherches résumées précédemment montrent de la façon la plus nette que les races résistantes aux anticorps trypanolytiques du cobaye, du lapin et du rat offrent des relations entre elles et peuvent être considérées comme très rapprochées, tandis que la race réfractaire aux trypanolysines de la poule occupe une place à part et apparaît entièrement indépendante des trois autres.

Nous sommes ainsi amenés à conclure que *les anticorps trypanocides élaborés par les trois espèces de rongeurs examinées par nous, offrent des caractères communs, tout en étant manifestement différents des anticorps produits, dans les mêmes conditions, par la poule, espèce ovipare plus éloignée des autres dans l'échelle animale.* Un seul et unique antigène peut donc provoquer la production d'anticorps microbicides profondément dissem-

blables, suivant l'espèce animale qui le reçoit; en d'autres termes, le même anticorps lytique, ou agglutinant, ou précipitant, peut offrir des différences de constitution, suivant l'espèce animale qui le fabrique, différences qui seront d'autant plus marquées, que les espèces productrices seront plus éloignées dans l'échelle des êtres vivants.

Ce qui nous amène à formuler cette conclusion, ce sont, en dehors des faits que nous venons d'exposer, nos expériences concernant les anticorps trypanolytiques élaborés par la *grenouille*, animal plus éloigné encore des mammifères, que ne l'est la poule.

Les recherches de Laveran et Pettit (1) ont montré que le sérum de grenouille exerce une action microbicide manifeste vis-à-vis des trypanosomes. Nous avons soumis des

(1) LAVERAN et PETTIT, *Comptes rendus de l'Acad. des sciences*, t. CXLIX, 1909, p. 500.

SÉRUMS PRÉPARÉS AVEC LA RACE Cob.-R.				SÉRUMS PRÉPARÉS AVEC LA RACE Rat.-R.			
1) Race Cob. R.-10.				1) Race Rat-R.			
Cob.-R.	Lap.-R.	Rat.-R.		Cob.-R.	Lap.-R.	Rat.-R.	
84				67			
85							
86							
2) Race Cob.-R. 1 ^{er} essai.				2) Race Rat-R ^b .			
Cob.-R.	Lap.-R.	Rat.-R.		Cob.-R.	Lap.-R.	Rat.-R.	
31				39			
32				40			
33				41			
34							
3) Race Cob.-R. 2 ^e essai.				3) Race Rat-R ^b . 2 ^e essai.			
Cob.-R.	Lap.-R.	Rat.-R.		Cob.-R.	Lap.-R.	Rat.-R.	
61				65			
62				66			
63				67			
64				68			

grenouilles à des injections répétées de trypanosomes du Nagana (émulsions riches en parasites obtenues par centrifugation du

sang de rats infectés) et nous avons préparé ainsi des sérums de batraciens vaccinés, très actifs au point de vue trypanocide. Or, malgré le pouvoir parasiticide intense de ces sérums et leur constitution analogue à celle des sérums correspondants de mammifères, ou de la poule (complément et ambocepteur), *il nous a été impossible de créer, avec ces sérums et le même Nagana-souche, une race de trypanosomes Grenouille-résistante.* Les souris inoculées avec des mélanges de sérum et de trypanosomes (trypanolyse complète *in vitro*) contractaient bien la trypanosomiase après quelques jours (tout comme les souris inoculées avec des mélanges de trypanolysines de mammifères et de flagellés), mais les parasites ne se montraient nulle-

SÉRUMS PRÉPARÉS AVEC LA RACE Lap.-R.	SÉRUMS PRÉPARÉS AVEC LA RACE Poule-R.
1) Race Lap.-R. 10. Cob.-R. Lap.-R. Rat.-R.	1) Race Poule-R. Poule-R.
36	36
Cob.-R. Lap.-R. Rat.-R.	Poule-R.
37	37
Cob.-R. Lap.-R. Rat.-R.	Poule-R.
33	33
	Poule-R.
	34
2) Race Lap.-Rm. Cob.-R. Lap.-R. Rat.-R.	2) Race Poule-R ^b . Poule-R.
44	44
Cob.-R. Lap.-R. Rat.-R.	Poule-R.
46	46
Cob.-R. Lap.-R. Rat.-R.	
3) Race Lap.-Rm. 2 ^e essai. Cob.-R. Lap.-R. Rat.-R.	3) Race Poule-R ^b . 2 ^e essai. Poule-R.
71	71
Lap.-R.	Poule-R.
72	72
Lap.-R.	

ment réfractaires aux anticorps, même après plusieurs passages consécutifs dans du sérum actif.

Il en résulte que *les anticorps spécifiques de la grenouille, obtenus à l'aide de l'antigène Nagana, sont encore plus différents de ceux des mammifères que les anticorps de la poule : ils ne permettent pas, dans les conditions où nous nous sommes placés, la préparation de races anticorps-résistantes.*

Aucun doute ne saurait donc subsister quant à la non identité des anticorps engendrés par le même antigène, mais élaborés par des espèces animales éloignées les unes des autres dans l'échelle des êtres vivants. *L'organisme imprime donc un cachet personnel aux réagines qu'il fabrique, sous l'incitation d'un antigène donné.*

Ce qui est intéressant, c'est de constater que, même chez les espèces de mammifères examinées par nous, les anticorps n'offrent pas une identité absolue, malgré les apparences. Nous voyons, en effet, qu'après un certain nombre de passages sur la souris, nos races Lapin-R, Cobaye-R et Rat-R se purifient : elles perdent plus ou moins leurs affinités secondaires et, avec la race Lapin-R, par exemple, on arrive à une spécificité absolue (sérum 57 et 58). Une telle race finit donc par se comporter comme celle de la poule, en ce sens qu'elle ne réagit que vis-à-vis des anticorps homologues et n'offre aucune affinité avec les autres races. Il y aurait donc lieu de conclure que, même chez certaines espèces de mammifères rapprochés les unes des autres, les anticorps élaborés sous l'influence d'un seul et unique antigène peuvent ne pas être entièrement identiques.

Quoi qu'il en soit, ce genre de recherches, qui utilise la plasticité des trypanosomes et leur faculté de réagir spécifiquement à l'égard des trypanolysines, rend des services appréciables en ce qui concerne la solution du problème : anticorps et espèces animales.

RECHERCHES EXPÉRIMENTALES
SUR
“ PLASMODIUM INUI ” HALBERSTÄDTER ET PROWAZEK
D'UN “ MACACUS CYNOMOLGUS ”

par M. LEGER et M. BOUILLIEZ
Médecins-majors des Troupes Coloniales.

(Travail du laboratoire du Professeur Mesnil.)

Nous entretenons depuis dix-sept mois par passages de singe à singe un *Plasmodium* trouvé en janvier 1912 dans le sang du cœur d'un *Macacus cynomolgus*. Ce macaque infecté était pensionnaire depuis une semaine de la ménagerie de l'Institut Pasteur. Il faisait partie d'un lot de cinq singes de même espèce qui moururent tous peu après leur arrivée à Paris. L'autopsie de l'animal ne révélait aucune lésion des organes à laquelle la mort fût imputable.

Dans une courte note (1), nous avons déjà fait connaître l'action pathogène de l'hématozoaire et succinctement indiqué les passages effectués durant les premiers mois. L'un de nous (2) a aussi brièvement publié le résultat de diverses recherches expérimentales.

Il nous paraît intéressant de décrire le parasite, de montrer les espèces simiesques qui sont sensibles et celles qui ne le sont pas, de relater un certain nombre d'expériences tentées avec ce *Plasmodium*, et de chercher à l'identifier.

(1) M. LEGER et M. BOUILLIEZ, Sur un *Plasmodium* des singes. Passages par espèces variées. Action pathogène. *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, 27 juillet 1912, t. LXXIII, p. 310.

(2) M. BOUILLIEZ, Nouvelles recherches expérimentales sur un *Plasmodium* des singes. *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, t. LXXIV, 17 mai 1913, p. 1070.

MORPHOLOGIE DU PARASITE

A. — EXAMEN A L'ÉTAT FRAIS. — Les hématozoaires apparaissent dans les globules rouges sous l'aspect de petits corps sphériques, ovoïdes ou amiboïdes. Quand ils sont jeunes, les schizontes sont sans pigment et assez difficiles à voir. Plus avancés en âge, la mobilisation du pigment permet de les distinguer. Les gamètes se reconnaissent toujours avec netteté, car ils contiennent du pigment brunâtre à grains plus gros et plus nombreux que ceux des schizontes, et doués d'un mouvement très vif.

Les seules formes libres sont des gamètes et les jeunes mérozoïtes au moment de la rupture des rosaces. Nous n'avons jamais pu assister à l'émission de flagelles par le microgamétocyte.

B. — EXAMEN APRÈS COLORATION. — Pour l'étude du *Plasmodium*, nous nous sommes surtout servis du Leishman. Mais de bonnes colorations peuvent aussi être obtenues par le Laveran, le Giemsa ou par la méthode à l'hématoxyline au fer.

Schizontes. — Au stade le plus jeune, le parasite, qui peut ne mesurer que $1\ \mu\ 75$ de diamètre, est annulaire, constitué par un mince liséré protoplasmique bleu ciel, sans aucune pigmentation apparente, et par un noyau vésiculaire, relativement très développé, dont le caryosome prend une coloration rouge rubis.

Toujours très visible et d'ordinaire arrondi, ce caryosome est tantôt à la périphérie, représentant le chaton d'une bague, tantôt au contraire au centre de la pseudo-vacuole incolore.

Le même hématozoaire possède parfois deux caryosomes, situés soit à deux pôles opposés, soit tout près l'un de l'autre; dans ce dernier cas, ils sont souvent réunis par un mince filament de chromatine. Il n'est pas rare de voir deux ou même trois hématozoaires dans la même hématie.

Le *Plasmodium* adolescent devient rapidement amiboïde et revêt les aspects les plus variés; plus rarement il reste compact et se montre sous l'aspect d'une écharpe transversale ou d'un poignard corse.

Le protoplasma prend une coloration bleu clair; la pigmen-

tation est nulle ou très peu accusée. Le noyau vésiculeux est généralement très apparent. Le caryosome, toujours volumineux, est souvent arqué ou en bâtonnet, et occupe dans le parasite les situations les plus diverses.

Le schizonte adulte s'arrondit de plus en plus. Les grains de pigment augmentent de nombre, sinon de taille, et cette fine poussière pigmentaire, dont il est impossible de numérer les éléments, communique au protoplasma une nuance verdâtre.

La division nucléaire commence avant que l'hématie ne soit entièrement envahie; d'ailleurs le parasite peut arriver à son complet développement, sans occuper la totalité de la cellule-hôte.

La schizogonie aboutit à la formation de douze à seize noyaux secondaires, qui se placent sans ordre à la périphérie. Chacun de ces noyaux s'entoure d'une zone protoplasmique. Le pigment, d'abord irrégulièrement disséminé, se concentre vers le milieu en amas de faible volume. On a finalement une sorte de rosace dont le nombre maximum des éléments est de seize.

Gamètes. — Les éléments sexués varient peu de fréquence d'un jour à l'autre; ils sont toutefois un peu plus nombreux dans les derniers jours de l'infection expérimentale qu'au début.

On reconnaît avec facilité les éléments mâles et les éléments femelles.

Le *microgamétocyte*, arrondi ou polyédrique, a un protoplasma de teinte bleu grisâtre, qui semble communiquée par le pigment dont les grains sont groupés en amas irrégulièrement distribués. Le noyau diffus se présente sous l'aspect de baguettes de chromatine noyées dans une gangue rose; il occupe près du quart du parasite.

Le *macrogamète*, souvent quadrilatère, est généralement un peu plus volumineux. Le protoplasma est bleu foncé. Les grains de pigment, plus fins que ceux de l'élément mâle, sont éparpillés sans ordre. Le noyau arrondi prend fortement la coloration rouge; il ne semble pas qu'il y ait d'aréole vésiculeuse.

Les jeunes gamètes se différencient facilement des schizontes de même taille par la présence de grains de pigment toujours très apparents.

Globules rouges. — Les hématies envahies par les schizontes ne sont ni hypertrophiées, ni déformées du fait de la présence

du parasite. On peut trouver deux *Plasmodium* adultes comprimés l'un contre l'autre dans la même cellule restée de taille normale.

Les globules rouges parasités par de très jeunes schizontes sont souvent réunis en amas. Il semble qu'une rosace venant de se rompre, on ait saisi en quelque sorte la pénétration des mérozoïtes mis en liberté dans les éléments immédiatement voisins.

Les éléments sexués ♂ et ♀ sont dans la presque totalité des cas endoglobulaires. Les hématies qui les reçoivent restent de taille normale, et souvent, même lorsque les gamètes paraissent à leur maximum de développement, ne sont pas occupées en entier.

Dans un nombre relativement peu élevé de cas, chez des singes d'espèces différentes, des granulations du type Schüffner (1) sont mises en évidence, avec le Leishman comme avec le Giemsa, sans toutefois pouvoir établir un rapport entre ces altérations globulaires et l'âge du *Plasmodium* ou sa nature sexuée ou asexuée. Jamais nous n'avons décelé de mouchetures de Maurer. Les hématies parasitées se colorent plus fortement que les saines.

A une période avancée de l'infection, il y a dans le sang du singe une anisocytose marquée avec prédominance de macrocytes : il est curieux de constater que ceux-ci ne sont pour ainsi dire jamais parasités, tandis que les microcytes le sont fréquemment. On trouve aussi un certain nombre de globules rouges polychromatophiles et quelques corps en demi-lune de Sergeant. Nous n'avons pas vu d'hématies à granulations basophiles ni d'érythroblastes.

DURÉE DU CYCLE SCHIZOGONIQUE. — La durée de l'évolution asexuée du *Plasmodium* a été recherchée par l'examen, un certain nombre de jours consécutifs, du sang des singes en expérience. Il y a toujours coexistence de générations plus ou moins nombreuses de parasites. On peut dire néanmoins que le cycle schizogonique de l'hématozoaire est celui de la tierce; il s'opère en quarante-huit heures.

Ainsi, chez le *Macacus sinicus* 16, les frottis prélevés les 14 et

(1) Sur les quelques lames colorées tout dernièrement par la méthode de Pappenheim (May-Grünwald Giemsa), les granulations de Schüffner n'étaient pas apparentes.

16 février, dans lesquels les parasites sont très nombreux, montrent des hématozoaires pour ainsi dire tous au même stade de développement: il s'agit de schizontes adolescents, très peu ou pas du tout pigmentés, revêtant les formes amiboïdes les plus variées.

Dans les frottis des 15, 17 et 19 février, bien que l'infection soit toujours intense (4 globule envahi sur 5 à 6), on ne trouve presque aucune des formes précédentes; on ne voit guère que des éléments en voie de division, des rosaces, quelques-unes parfaites à douze ou seize éléments, et quelques très jeunes schizontes.

Notre *Plasmodium* ne peut être assimilé à aucune des trois espèces ou variétés d'hématozoaires du paludisme de l'homme. Il condense en quelque sorte leurs principaux caractères.

Il ressemble à *Pl. vivax* par certaines formes amiboïdes des schizontes adolescents, la présence de granulations de Schüffner, la durée de l'évolution en quarante-huit heures, la schizogonie en seize mérozoïtes, le pigment à grains fins.

De même que *Pl. præcox* et *Pl. malarix*, il n'entraîne jamais l'hypertrophie du globule rouge. Au premier des deux, il emprunte la petite forme annulaire des schizontes jeunes, souvent à deux caryosomes. D'autres parasites, plus avancés en âge, paraissent identiques aux formes dites « en bandeau » de la quarte. Les gamètes arrondis, dans des cellules de taille normale, et à grains de pigment relativement gros, rappellent aussi beaucoup ceux de *Plasmodium malarix*.

TRANSMISSION PAR INOCULATION DE SINGE A SINGE

Presque toutes les inoculations ont été pratiquées dans la musculature de la cuisse, quelques-unes seulement dans le tissu cellulaire sous-cutané ou dans le péritoine. Le sang parasité servant à l'inoculation, recueilli soit à l'oreille de l'animal vivant porteur de virus, soit au cœur après la mort, était mélangé le plus généralement à 2/3 d'une solution de citrate de soude à 10 p. 1000 dans de l'eau physiologique à 6 p. 1000. La quantité totale de liquide inoculé était d'ordinaire de 4 cent. cube à 1 c. c. 5.

Un examen préalable des singes neufs a permis d'en éliminer

deux qui étaient déjà parasités. Nous avons trouvé une fois le même *Plasmodium* chez un macaque, et une fois *Plasmodium Kochi* à l'état de gamètes chez un Cercopithèque callitriche.

PREMIER PASSAGE. — *Macacus sinicus* 91, inoculé le 24 janvier 1912, dans le péritoine, avec quelques gouttes de sang du cœur du *Macacus cynomolgus*, trouvé spontanément infecté. Parasites rares le 31 janvier, nombreux le 2 février. Le lendemain matin l'animal tombe pour ainsi dire foudroyé.

Rien à l'autopsie. Les organes thoraciques ou abdominaux paraissent normaux, à l'exception de la rate qui est congestionnée. Le cerveau ne présente à la coupe aucune altération visible.

DEUXIÈME PASSAGE. — *Macacus sinicus* 16 reçoit, sous la peau, le 3 février au soir, quelques gouttes de sang recueillies dans le cœur du *Sinicus* 91, huit heures après la mort. Parasites rares le 11 février, nombreux le 12, très nombreux à partir du 14 jusqu'à la mort, le 21 février. De caractère gai et enjoué, le singe est devenu triste et indolent au moment de l'infection.

A l'autopsie, sang du cœur pâle et fluide, avec très nombreuses hématies envahies. Vessie pleine d'urines claires. Poumons décolorés. Rate du poids de 14 grammes (1) en bouillie. Foie pesant 80 grammes, normal à la coupe. Les frottis de poumons, de foie et de rate montrent une très grande quantité de pigment brun-noirâtre ou franchement noir, en amas parfois considérables, irrégulièrement répartis. Du pigment se trouve aussi inclus dans des leucocytes mononucléaires et quelques cellules épithéliales.

TROISIÈME PASSAGE. — Trois singes ont été inoculés le 17 février 1912 avec le sang du précédent.

a) *Cercocebus fuliginosus* 63 reçoit, sous la peau, 0 c. c. 5 de sang. Ne s'infecte pas. Réinoculé dans le péritoine dix jours après avec 1 c. c. 5 de sang à parasites nombreux du *Cynomolgus* 46, puis en juin avec le sang du *Cynomolgus* 98, il est suivi pendant plusieurs mois sans présenter de *Plasmodium*.

b) *Papio anubis* (cynocéphale), inoculé sous la peau le 17 février, présente des parasites dès le 22. Ceux-ci augmentent sans cesse jusqu'à la mort qui survient le 4 mars, après onze jours de maladie.

c) *Macacus cynomolgus* 46 réagit différemment à l'inoculation également sous-cutanée; il contracte une affection chronique qui le conduit à la mort au bout de neuf semaines, le 22 avril.

Après une courte incubation de cinq jours, les *Plasmodium* se montrent rares du 23 février au 26 et nombreux du 27 au 3 mars. Le nombre des parasites diminue alors : assez nombreux du 4 au 6, rares le 7, très rares du 9 au 30. Une poussée légère se produit du 4 au 8 avril et les *Plasmodium* sont non rares. Ils redeviennent ensuite rares ou ne sont plus du tout trouvés jusqu'au moment de la mort.

Pendant la maladie, la température est prise de façon régulière tous les soirs; à aucun moment il n'y a véritablement fièvre (dans la dernière semaine de février, variations de 36°3 à 37°8).

QUATRIÈME PASSAGE. — Trois animaux sont inoculés à des dates différentes avec le *Cynomolgus* 46.

a) *Maki* de Madagascar (Lémurien) qui reste indemne.

(1) Et non 148, comme il a été imprimé par erreur dans notre note préliminaire.

b) *Macacus sinicus* 90, mort six jours après l'inoculation sans avoir présenté aucun parasite.

c) *Macacus sinicus* 94 est inoculé le 23 avril, avec du sang prélevé dans le cœur du *Cynomolgus* 46 et dans lequel on ne voit pas de parasites sur frottis colorés. Le singe s'infecte. Il présente une série de rechutes séparées par des intervalles de dix à onze jours, pendant lesquels le sang périphérique ne contient pas d'hématozoaires. Les deux premières rechutes durent respectivement dix et sept jours, les parasites étant moins nombreux la seconde fois. Les *Plasmodium* reparaissent une troisième fois le 10 juin et restent rares, très rares ou extrêmement rares jusqu'au 5 juillet. A partir de cette date on n'en voit plus. La mort survient le 6 décembre.

En août et en novembre, le *Sinicus* 94 est réinoculé avec du sang très virulent sans que l'on arrive à produire une nouvelle infection.

A l'autopsie, le foie et la rate, ni congestionnés ni hypertrophiés, contiennent une notable proportion de pigment. Pas de parasites à l'examen du sang du cœur, mais un singe inoculé avec ce sang s'infecte. Dans des frottis de rate et de moelle osseuse, on met en évidence une rosace et un schizonte. On constate une maladie polykystique des reins.

CINQUIÈME PASSAGE. — Plusieurs singes sont inoculés avec le sang du précédent à différents moments de son infection.

a) *Macacus cynomolgus* 99, du poids de 2 kil. 230, inoculé une première fois sans résultat le 9 mai. Réinoculé le 25, il montre des parasites le 3 juin. Sa maladie revêt l'allure chronique, présentant une série de rechutes.

Les *Plasmodium* augmentent d'abord de nombre jusqu'au 14 juin sans être jamais très nombreux. Ils diminuent ensuite pour disparaître complètement du 10 au 16 juillet. Quelques gamètes sont aperçus les 17 et 18, puis les schizontes reparaissent et augmentent en nombre chaque jour jusqu'au 1^{er} août. Les parasites disparaissent de nouveau complètement du 13 au 20 août, jour de la mort.

Des granulations de Schüffner étaient visibles sur les frottis faits avec le sang pendant la deuxième rechute.

A l'autopsie on note : vessie très distendue, remontant jusqu'à l'ombilic, pleine d'urines claires. Cœur, foie, reins paraissent normaux. Rate légèrement atrophiée, adhérente à la paroi abdominale. Pancréas gros et dur.

Une splénectomie ayant été pratiquée le 18 juillet, nous aurons à examiner les rapports de la rechute avec l'intervention opératoire.

b) *Macacus cynomolgus* 118, du poids de 800 grammes, inoculé le 25 mai et parasité à partir du 4 juin. La maladie prend aussi chez lui une allure chronique et évolue en deux accès, le premier faible et long, le second encore moins accentué.

Une inoculation de trypanosomes le 22 juillet, pendant la période sans parasite qui suivit la rechute, ne provoqua pas la réapparition du *Plasmodium*. Le singe mourut le 15 avril, avec quelques trypanosomes dans la circulation. Rien de particulier à l'autopsie. Rate : 10 grammes.

c) *Macacus rhesus* 100, reçoit du sang pris au cœur à la mort du *Sinicus* 94. Inoculé le 6 décembre, il laisse voir à partir du 17 des parasites jamais nombreux. Les hématozoaires disparaissent du 21 au 26 décembre, pour reparaître le 27 et persister jusqu'à la mort de l'animal, survenue le 31 décembre. Ce singe a été traité par la quinine.

Un *Cynomolgus* 13, inoculé avec son sang le 30 décembre, ne s'infecte pas.

SIXIÈME PASSAGE. — Plusieurs singes d'espèces différentes sont inoculés avec le sang du *Cynomolgus* 99.

a) *Cercocebus fuliginosus* 65, qui reste encore indemne.

b) *Hapale* (ouistiti) qui meurt en sept jours sans présenter de parasites dans son sang. A l'autopsie, on n'en trouve pas sur frottis de divers organes.

c) *Macacus rhesus* 98, inoculé le 18 juin et parasité dès le 24. Les hématozoaires, très rares les 24, 25 et 26, deviennent très nombreux le 27, augmentent au point de parasiter à peu près la moitié des hématies. L'animal meurt le 29, après avoir présenté de l'hématurie; son sang renferme surtout des jeunes formes de parasites.

A l'autopsie, foie et rate légèrement congestionnés. Capillaires du cerveau bourrés de globules parasités.

d) *Macacus cynomolgus* 1000, inoculé le 29 juillet et parasité dès le 5 août. Il meurt le 12 août, ayant eu chaque jour un plus grand nombre d'hématozoaires. Sa mort survient au moment où les formes jeunes, très petites, dominant. Beaucoup de jeunes *Plasmodium* ne sont pas encore entrés dans les globules rouges. A l'autopsie, rien de particulier.

SEPTIÈME PASSAGE. — a) *Cercopithecus patas* 10 est inoculé, le 29 juin, avec le sang du *M. rhesus* 98. Dès le 3 juillet, les parasites apparaissent; ils augmentent rapidement de nombre et l'animal meurt d'un véritable accès pernicieux le 7 août, au moment de l'éclatement des rosaces. Presque tous les globules rouges sont envahis. Les capillaires du cerveau sont encombrés de parasites. Foie et rate légèrement congestionnés; urines claires.

Le sang du *Cercopithecus patas* 10 sert à inoculer un *Chimpanzé* femelle (Adrienne) qui reste indemne.

b) *Cercopithecus patas* 38, est inoculé le 12 août, avec le sang du *M. cynomolgus* 1000. Très parasité le 19, il reçoit le soir une injection intra-musculaire de 0,45 centigrammes de chlorhydrate neutre de quinine (poids de l'animal : 2 kil. 100) qui n'arrête nullement le développement du *Plasmodium*. Le lendemain matin, nouvelle injection de 0,45 centigrammes de quinine. Les parasites examinés d'heure en heure ne paraissent nullement souffrir du sel injecté. Ils continuent à se développer. Le 20 au soir, il meurt pendant une injection intraveineuse de quinine que nous tentions.

De toute façon, étant donnés le nombre de parasites dans la circulation et la marche ordinaire de la maladie chez le *Cercopithèque*, la mort serait survenue dans la nuit.

c) *Macacus cynomolgus* 332 est également inoculé le 12 août avec le même sang que le précédent. Parasité le 19, il reçoit le 20 une injection intramusculaire de 0,15 centigrammes de chlorhydrate de quinine (poids de l'animal : 750 grammes). Malgré les accidents qui accompagnent cette injection : vertiges et étourdissements (ivresse quinique) et qui paraissent indiquer pour cet animal une dose très forte, le *Plasmodium* continue à se développer jusqu'à la mort, survenue le 24, sans que l'animal ait repris son état normal.

HUITIÈME PASSAGE. — Deux singes sont inoculés avec le sang du *Cercopithecus patas* 38.

a) *Macacus cynomolgus* 41, inoculé le 20 août et montrant des parasites le 31 août. Le *Plasmodium* est toujours rare. On ne l'observe pas du tout, du 18 août au 1^{er} septembre. Après avoir dépéri lentement depuis son arrivée à la singerie, il meurt le 26 octobre 1912. A l'autopsie, il est trouvé porteur de très nombreux trichocéphales, cause probable de son état cachectique.

b) *Cercopithecus cephus*, inoculé le 19 août, montre déjà d'assez nombreux parasites le 27. Ceux-ci restent nombreux jusqu'au 2 septembre, puis deviennent rares et apparaissent par intermittence jusqu'au 4^{er} octobre. On en revoit quelques-uns les 7, 10 et 12 de ce mois. Une splénectomie est prati-

quée le 25. Des parasites apparaissent le 28 et deviennent assez nombreux jusqu'au 1^{er} novembre, jour de la mort, due à une péritonite post-opératoire. Les parasites sont assez nombreux dans le sang du cœur; beaucoup de globules parasités présentent des granulations de Schüffner.

NEUVIÈME PASSAGE. — *Cercopithecus callitrichus*, du poids de 650 grammes, est inoculé avec le sang du *Cercopithecus cephus* le 30 octobre. Assez rares le 6 novembre, les *Plasmodium* augmentent sans cesse, pour devenir excessivement nombreux et entraîner la mort de l'animal le 12 novembre. A ce moment-là, le sang, en plus des tout jeunes schizontes en très grand nombre, ne contient pas d'autres formes parasitaires. Le foie, la rate, la moelle osseuse, congestionnés, renferment beaucoup de pigment. Le foie a une couleur ardoisée. Au moment de l'agonie, le singe émet des urines hémoglobini-riques. Les capillaires du cerveau ne contiennent pas énormément de globules parasités ou pigmentés.

DIXIÈME PASSAGE. — *Macacus cynomolgus* 306 (poids 1 kil. 650) reçoit du sang du précédent le 12 novembre. Les parasites se montrent dès le 18 et, en se multipliant, amènent rapidement la mort de l'animal le 22 au soir.

Foie ardoisé, volumineux. Rate noire et congestionnée. Rien d'anormal par ailleurs. L'animal, malade peu de temps, est encore très gras.

ONZIÈME PASSAGE. — *Macacus cynomolgus* 818 et *M. cynomolgus* 819 sont inoculés le 22 novembre avec le sang du précédent.

L'un d'eux, le 818, reçoit en même temps, dans la cuisse opposée, une injection de 7 centigrammes de chlorhydrate de quinine (poids : 900 grammes) à titre préventif. Aucun parasite n'est aperçu du 23 novembre au 17 décembre.

Le second, le 819, montre des hématozoaires dès le 25 novembre. Ceux-ci augmentent rapidement et amènent la mort du singe dans la nuit du 3 au 4 décembre, au moment où les rosaces viennent d'éclater. Beaucoup de globules sont parasités par trois ou quatre très petits schizontes. Le sang est très peu coloré.

A l'autopsie, le foie et la rate, peu hypertrophiés, sont assez colorés par le pigment. On trouve dans les frottis d'innombrables petits parasites et, dans la rate seulement, un grand nombre de formes en rosaces à huit éléments. Le cerveau est pigmenté légèrement et renferme beaucoup de globules avec petits parasites. Le tissu graisseux existe encore.

DOUZIÈME PASSAGE. — a) *Chimpanzé mâle* (Pascal), ne prend pas l'infection malgré une inoculation de 5 cent. cubes de sang citraté du précédent, le 4 décembre.

b) *Macacus nemestrinus*, du poids de 2 kil. 500, inoculé en même temps, présente des parasites à partir du 14 décembre. Il a une infection sanguine légère jusqu'au 8 janvier. De cette date jusqu'au 19 février, il laisse de temps en temps apercevoir quelques très rares *Plasmodium*. On n'en voit plus ensuite jusqu'au 9 mai.

Le singe est alors splénectomisé. Aucun parasite n'apparaît dans le sang jusqu'à la mort le 18 mai, attribuable aux suites éloignées de l'intervention. A l'autopsie, les frottis de rate ne montraient pas de *Plasmodium*.

TREIZIÈME PASSAGE. — Deux singes sont inoculés avec le *Nemestrinus*.

a) *Macacus cynomolgus* 818, resté une première fois indemne après injection de quinine préventive. Inoculé de nouveau le 17 décembre, laisse voir des parasites dès le 23. L'infection suit son cours; les parasites augmentent et sont nombreux le 25. Ce macaque meurt alors d'une infection microbienne mal déterminée qui fit à cette époque plusieurs victimes à la Singerie de l'Institut Pasteur.

b) *Macacus cynomolgus* 13, inoculé précédemment sans succès. Réinoculé le 17 janvier, il a des parasites à partir du 24 et meurt le 27.

QUATORZIÈME PASSAGE. — *Macacus rhesus* 2, du poids de 2 kil. 600, est inoculé le 27 janvier avec le sang du précédent. Il a quelques *Plasmodium* dès le 31 janvier. Les parasites augmentent rapidement et la mort survient le 5 février.

A l'autopsie : gros foie ardoisé ; rate hypertrophiée et fortement colorée. Tissu graisseux abondant.

QUINZIÈME PASSAGE. — *Macacus cynomolgus* 69, inoculé le 8 février avec le sang du précédent, prélevé après la mort et conservé depuis trois jours à la glacière. Le *Plasmodium* se montre à partir du 17 février et augmente en nombre jusqu'à l'agonie de l'animal, le 22.

Dans le but d'utiliser son sang, l'animal est saigné et tué dès qu'il paraît condamné à une mort prochaine.

Rien à signaler de particulier à l'autopsie, se rapportant du moins au *Plasmodium*. Nombreuses amibes dans le gros intestin, trichocéphales ; quelques ulcérations intestinales.

SEIZIÈME PASSAGE. — *Macacus sinicus* 609, inoculé le 21 février avec le sang du précédent. Le *Plasmodium* apparaît dès le 28 et reste toujours en petit nombre. Affection très peu intense jusqu'au 19 mars. On ne trouve plus depuis de parasites, sauf de très rares schizontes aux examens des 9 et 10 mai et des schizontes moins rares du 3 au 5 juin.

Le 25 avril, avec le sang du *Sinicus* 609, on inocule sans succès un singe neuf, qui ne s'infecte pas, le *Macacus nemestrinus* du douzième passage, et l'animal lui-même.

Le *Sinicus* 609 est encore en vie le 15 novembre.

DIX-SEPTIÈME PASSAGE. — *Macacus cynomolgus* 847, inoculé le 5 mars avec le sang du *Sinicus* 609, reçoit en même temps dans la cuisse opposée une injection préventive de 12 centigrammes de chlorhydrate de quinine (poids : 1 kil. 300). Pas de parasites jusqu'au 25 mars. Il meurt alors. Nombreux ankylostomes dans l'intestin.

Macacus rhesus 856, inoculé le 25 mai sans succès avec le sang du *Sinicus* 609 ; est réinoculé le 4 juin avec le même sang, au moment d'une rechute. Nombreux parasites dès le 9 ; mort le 12, de son infection.

MALADIE EXPÉRIMENTALE DES SINGES

Nous avons inoculé le *Plasmodium* recueilli sur un *Macacus cynomolgus* à toutes les espèces simiesques que nous avons eues à notre disposition, et réussi dix-sept passages. Le virus a alors été abandonné.

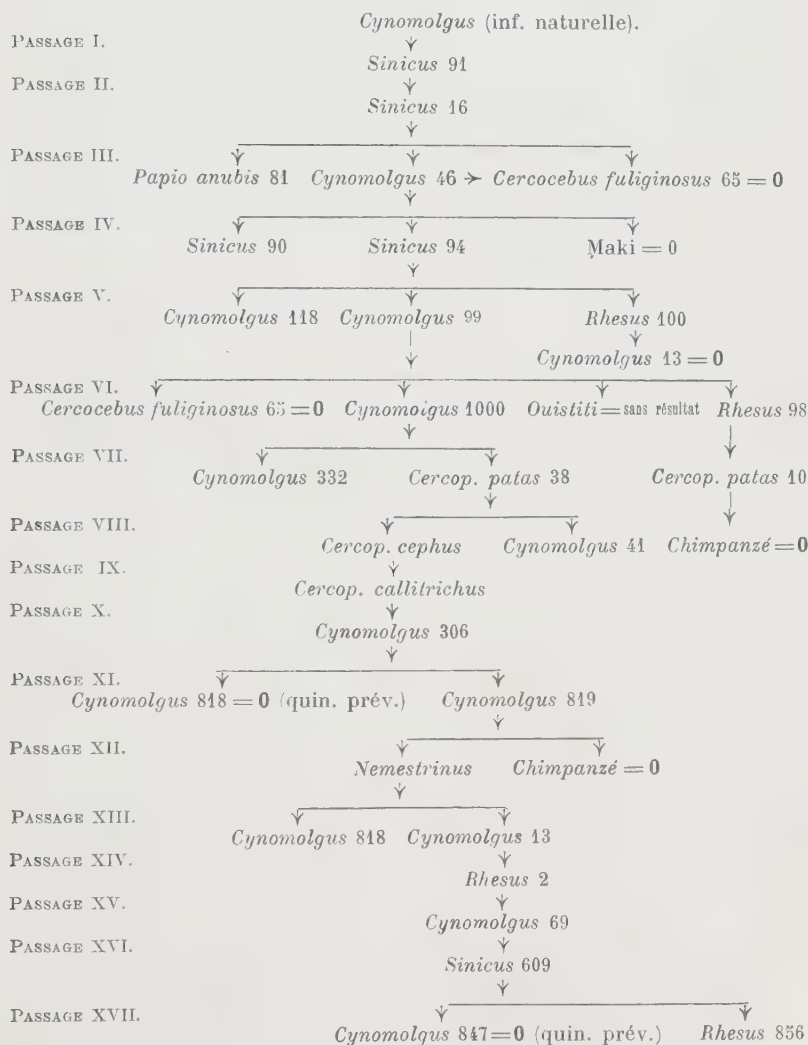
L'infection de beaucoup d'espèces ou variétés de singes est possible. Nous avons infecté les macaques : *M. cynomolgus*, *sinicus*, *rhesus*, *nemestrinus* ; les cercopithèques : *C. callitrichus*, *patas*, *cephus* ; le cynocéphale : *Papio anubis*.

Vingt-cinq singes d'espèces sensibles au *Plasmodium* ont été infectés par voie intramusculaire ou sous-cutanée. Nous ne

tenons compte en ce moment, ni du *Sinicus* 90, mort six jours après l'inoculation sans avoir présenté de parasites dans le sang, ni du *Cynomolgus* 847 ayant reçu préventivement de la quinine. 2 *Cynomolgus* réinoculés figurent chacun deux fois sur notre tableau récapitulatif.

PASSAGES EN SÉRIES DE SINGE A SINGE

(TABLEAU RÉCAPITULATIF.)



Les 11 *M. cynomolgus* traités ont réagi; deux d'entre eux ne se sont infectés qu'à la seconde inoculation, et avec la durée ordinaire d'incubation, la première injection ayant pourtant été faite dans des conditions en apparence identiques à toutes les autres.

Aucun échec n'a été relevé avec 4 *Macacus rhesus*, 1 *M. nemestrinus*, 4 *M. sinicus*.

Les Cercopithèques sont au moins aussi sensibles que les macaques. L'infection a été de règle absolue. 4 animaux ont été en expérience: 1 *Cercopithecus callitrichus*, 1 *C. cephus*, 2 *C. patas*. Le passage facile du virus d'un macaque à un singe d'une autre famille des Catarrhiniens est intéressant à noter. Constataion identique avait déjà été faite par Martin Mayer, puis par Flu avec leur *Pl. cynomolgi*.

La même réflexion s'impose à propos du cynocéphale, dont l'infection a été réalisée très facilement. Le *Papio anubis* est sensible au virus du *M. cynomolgus*.

Certains singes se sont montrés réfractaires à notre *Plasmodium*. Deux chimpanzés ne se sont pas infectés même après inoculation chez l'un d'eux de la dose relativement très élevée de 5 cent. cubes de sang d'un singe à hématozoaires très nombreux. Il en a été de même du *Cercocebus fuliginosus* inoculé à trois reprises avec 0,5 et 1 c. c. 5 de sang riche en parasites. Dans les essais en question, tous les animaux témoins se sont infectés.

Un lémurien, le Maki de Madagascar, reste également indemne.

L'expérience tentée sur le Ouistiti (*Hapale* sp.?) ne comporte pas d'interprétation. L'animal est mort le septième jour, sans présenter d'hématozoaires dans le sang; on ne peut affirmer qu'il n'en présenterait pas après une incubation plus longue.

Comme exemple de singes insensibles à un *Plasmodium* de macaques, nous n'avons jusqu'ici que l'Orang-Outang auquel Halberstaedter et Provazek n'ont pas réussi à inoculer leur *Plasmodium inui*.

L'action pathogène de notre *Plasmodium* est indiscutable. La mort de la majeure partie des singes que nous avons infectés peut être attribuée à l'hématozoaire en question. L'infection n'évolue cependant pas de façon identique. Tout en reconnaissant que les intermédiaires peuvent exister, nous décrirons

deux formes de la maladie expérimentale, une *forme aiguë* et une *forme chronique*.

FORME AIGUE. — C'est la plus fréquente. Nous l'avons observée seize fois sur vingt-cinq.

Quelle que soit la voie d'inoculation, la période d'incubation est courte. Elle ne dépasse pas neuf jours; elle peut n'être que de quatre jours. Le relevé de nos observations donne comme durée de l'incubation : 4 jours (2 fois), 5 jours (4), 6 jours (4), 7 jours (4), 8 jours (1), 9 jours (1 fois).

Les hématozoaires, apparaissant dans le sang périphérique, augmentent très rapidement, et deviennent extrêmement nombreux. La moitié des globules rouges peut être envahie. Beaucoup d'hématies renferment deux ou même trois parasites.

Le singe subitement devient triste et abattu. Il ne mange plus, sans présenter aucun autre trouble digestif; en particulier, il n'a pas de diarrhée. Chez un *Cercopithecus callitrichus*, nous avons noté de l'hémoglobinurie; chez un *Macacus rhesus*, de l'hématurie.

La mort survient en moyenne dix jours après l'inoculation virulente, jamais après 18 jours. Nous avons noté des chiffres de 8 jours (4 fois), 9 (1 fois), 10 (3 fois), 11 (2 fois), 13 (1 fois), 14 (2 fois), 15 (1 fois), 18 (1 fois).

La durée réelle de la maladie, de l'apparition des parasites dans le sang au décès, est extrêmement courte. Elle n'a jamais dépassé dix jours. Chez le *M. cynomolgus* 13, les *Cercopithecus patas* 10 et 38, le *M. sinicus* 91, elle a été de trois à quatre jours; elle est d'ordinaire de cinq à six jours. Il semble que les animaux soient enlevés par un véritable accès pernicieux algide analogue à celui de l'homme.

L'examen du sang à la période agonique, qui est d'ailleurs très courte, corrobore ces vues. Il y a envahissement d'un nombre tel d'hématies que la vie n'est plus possible. On trouve alors uniquement de tout jeunes schizontes, provenant de la rupture de rosaces d'une même génération.

A l'autopsie, on constate que l'hypertrophie du foie ou de la rate n'est pas toujours appréciable; mais ces organes sont ardoisés ou même noirs. Le poumon est souvent décoloré. Les frottis de foie, de rate ou de poumons montrent une infiltration pigmentaire abondante. Le pigment est en amas libre ou est

contenu à l'intérieur de grands mononucléaires et de cellules épithéliales. Le sang du cœur est pâle et fluide. Quand le corps est ouvert peu après la mort, ce sang contient des hématies parasitées en très grande abondance. Les globules rouges des capillaires du cerveau sont parfois également bourrés d'hématozoaires. On trouve aussi les *Plasmodium* sur les frottis des divers organes et de la moelle osseuse. L'animal, enlevé avec une telle brusquerie par l'infection, n'a pas perdu de poids. Le tissu adipeux est abondant.

La forme aiguë de la maladie expérimentale frappe toutes les espèces simiesques sensibles. Nous l'avons constatée chez 7 des 11 *Macacus cynomolgus*, 2 des 4 *M. sinicus*, 3 des 4 *M. rhesus*, les 2 *Cercopithecus patas*, le *Cercopithecus callitrichus* et le *Papio anubis*.

La virulence du *Plasmodium* n'a été ni augmentée ni diminuée au cours des dix-sept passages que nous avons réussis.

FORME CHRONIQUE. — C'est vraisemblablement de cette forme qu'était atteint le *M. cynomolgus*, sur lequel notre *Plasmodium* fut observé pour la première fois le 24 janvier 1912.

Dans certaines conditions, absolument indéterminées, mais qui ne dépendent ni de l'espèce du singe, ni de l'âge, ni de la voie d'inoculation ou de la quantité de virus inoculée, la maladie expérimentale, au lieu d'enlever en quelques jours l'animal, affecte une marche chronique. Elle évolue par rechutes successives, séparées par des périodes de durées variables.

L'infection a revêtu la forme chronique chez 9 des 24 animaux suivis : 4 *M. cynomolgus*, 2 *M. sinicus*, 1 *M. rhesus*, 1 *M. nemestrinus*, 1 *Cercopithecus cephus*.

L'incubation n'est pas sensiblement plus longue que dans la forme aiguë : le *M. sinicus* 94 par exemple a été trouvé porteur d'hématozoaires le cinquième jour. La durée moyenne a été de sept jours et demi. L'incubation la plus longue a été de onze jours.

La forme chronique est caractérisée par la disparition à certains moments des hématozoaires du sang. Ceux-ci, très rares au début, augmentent pendant quelques jours sans jamais devenir très nombreux ni même nombreux, puis, brusquement ou après une période de diminution progressive, disparaissent de la circulation périphérique. La crise est souvent d'une

semaine. Elle peut atteindre un mois. La rechute a lieu avec réapparition des *Plasmodium* en nombre égal ou un peu inférieur à celui de la première fois.

Le nombre des rechutes est limité. Il n'y en a généralement que deux, exceptionnellement trois. L'infection sanguine s'atténue progressivement.

Le singe, durant les cinq ou six premières semaines, ne paraît nullement souffrir de son parasitisme. Plus tard, il devient indolent et taciturne. Il ne mange plus. Il a parfois de la diarrhée. Il maigrit. Nous n'avons jamais observé ni hématurie ni hémoglobinurie.

La température de l'animal ne paraît pas très influencée par la présence dans le sang du *Plasmodium*. Les ascensions qu'il détermine sont en général très faibles. C'est exceptionnellement que nous avons noté 39°4 chez le *Macacus sinicus* 94, les hématozoaires étant alors nombreux.

Chez le *M. cynomolgus* 46, le seul singe chez lequel la température a été prise régulièrement pendant toute la maladie expérimentale, il n'y eut à aucun moment de fièvre véritable. La courbe s'est maintenue assez régulièrement entre 36°8 et 37°1. De faibles oscillations thermiques ont été seules notées les 23 et 24 février (37°8 et 37°6), coïncidant avec l'apparition des *Plasmodium* dans la circulation périphérique, les 27 et 28 février (37°8 et 37°5), les 1^{er} et 3 mars (37°5).

On sait que les autres *Plasmodium* de singes, à l'exception du *Plasmodium* voisin de *Pl. Kochi* décrit par Martoglio, Stella et Carpano chez *Cercopithecus sabæus*, évoluent sans réaction thermique. C. Mathis et M. Leger, qui ont pris régulièrement des mois entiers la température de leurs singes infectés, n'ont observé quelques ascensions thermiques que durant les premières semaines de la maladie, sans noter aucune périodicité, et sans qu'il y ait corrélation entre le degré thermométrique et le nombre des parasites dans le sang périphérique.

Tous nos singes, sauf un, chez lesquels la maladie expérimentale revêtait la forme chronique, ont succombé au bout d'un temps plus ou moins long. Au moment de la mort, il n'y a plus de parasites dans le sang depuis des temps variables et la mort doit sans doute être attribuée à d'autres causes.

Dans nos expériences, la terminaison fatale est survenue au

bout de 64, 67, 73, 82, 87, 167, 228 jours. Le *Macacus rhesus* 25 est mort le 25^e jour, peut-être des suites d'une intoxication quinique. Un animal infecté est encore en vie au bout de 9 mois : le *Macacus sinicus* 609, du seizième passage. Il n'est peut-être pas guéri. En effet, le *M. sinicus* 94, qui a survécu 228 jours, ne montra pas de parasites dans son sang périphérique durant les six derniers mois de son existence : un singe inoculé avec le sang de son cœur prélevé à l'autopsie, contracta pourtant une maladie à forme aiguë (*M. rhesus* 100) ; d'ailleurs des *Plasmodium* en très petit nombre furent décelés sur les frottis de rate et de moelle osseuse. Le *M. nemestrinus* n'a montré à la mort, survenue à la suite d'une splénectomie, aucun parasite.

Les lésions trouvées à l'autopsie des singes morts de maladie chronique ne présentent rien de bien spécial, sinon l'infiltration pigmentaire des organes. Le foie et la rate ne sont que peu hypertrophiés. Les parasites ne sont rencontrés qu'à titre d'exception dans les frottis du sang du cœur, sur les frottis des organes et dans les capillaires du cerveau.

Le *Plasmodium* étudié à l'Institut Pasteur est nettement pathogène : l'infection est sévère, et, dans la très grande majorité des cas, sinon toujours, mortelle.

Ce caractère distingue donc notre hématozoaire de tous les *Plasmodium* de singe étudiés jusqu'à ce jour, à l'exception de celui que viennent de décrire Blanchard et Langeron, et que ces savants expérimentateurs identifient à *Pl. cynomolgi* Mayer.

Le *Plasmodium Kochi* n'influe en rien sur l'état général de l'animal.

Les orangs-outangs de Halberstaedter et Prowazek, porteurs de *Plasmodium pitheci*, n'étaient pas malades.

Le *Plasmodium brasilianum* de Gonder et Berenberg-Gossler a été trouvé chez un singe transporté en Allemagne depuis longtemps et ne paraissant nullement souffrant.

Halberstaedter et Prowazek ont insisté sur l'absence de phénomènes morbides déterminés par leur *Plasmodium inui*. Martin Mayer a fait des constatations identiques. Le *Cynomolgus* du Jardin Zoologique de Hambourg parasité par *Plasmodium cynomolgi* jouissait d'une bonne santé. Les divers macaques et cercopithèques inoculés avec ce virus par Mayer ou par Flu

s'anémiaient parfois, mais guérissaient et étaient réinfectables.

L'hématozoaire que C. Mathis et M. Leger ont rencontré chez les singes du Tonkin (*Macacus rhesus* et *M. lasiotis tcheliensis*) et qu'ils rapportent à *Pl. inui* n'était pas non plus pathogène. Des singes, trouvés naturellement parasités (5 sur 40 animaux examinés), ont été suivis pendant deux ans. L'infection ne se traduit par aucun symptôme. La vivacité de l'animal n'est pas affaiblie et il n'y a aucune modification dans ses allures. Les parasites, dont le nombre varie d'un jour à l'autre, persistent longtemps, mais l'infection s'atténue progressivement. Les six macaques que C. Mathis et M. Leger ont inoculés avec leur virus ont tous présenté une maladie de longue durée (plus d'un an) mais bénigne.

Depuis que nous avons signalé en juillet 1942, dans notre note à la *Société de Biologie*, l'action pathogène du *Plasmodium* que nous étudions, Blanchard et Langeron ont fait paraître (avril 1943) une étude, très bien illustrée, sur un *Plasmodium* de macaques, analogue au nôtre, dont l'inoculation à un animal de même espèce détermine une infection suraiguë.

Chez un *Macacus cynomolgus*, acheté à Paris, Blanchard et Langeron ont décelé un hématozoaire endoglobulaire pigmenté qui, inoculé à deux macaques, entraîna rapidement la mort de l'un d'eux en douze jours; le second n'eut qu'une infection bénigne « en quelque sorte latente », et survécut plus de huit mois.

Chez le premier de ces singes, les parasites apparurent dans le sang après cinq jours d'incubation; ils augmentèrent progressivement de nombre, et, dans les derniers jours, il y eut une « véritable explosion de petites formes annulaires ». L'animal mourut en hypothermie d'un véritable accès pernicieux, dont la genèse serait identique à ce que l'on observe chez l'homme. Les organes, et en particulier la rate, contenaient un nombre « prodigieux d'hématozoaires. Les hématies envahies dépourvues de leur hémoglobine ne peuvent plus remplir leur rôle respiratoire et, en outre, au moment de la mise en liberté des mérozoïtes, elles déversent à la fois une grande quantité de toxines dans tous les points de l'organisme ».

Pour expliquer la bénignité de l'infection déterminée chez le deuxième singe, Blanchard et Langeron pensent avoir eu affaire

à un animal devenu résistant au virus par une atteinte antérieure en son pays d'origine.

Le fait est possible. Notre *Macacus sinicus* 94 du quatrième passage, ne présentant pas de parasites depuis quatre, puis seize semaines, fut à deux reprises réinoculé avec du sang richement infecté sans présenter une poussée nouvelle de *Plasmodium*. Ce singe n'était pourtant pas guéri, comme le montre la lecture de son observation. Dans tous les cas, il est nécessaire d'admettre qu'il y a des premières infections assez bénignes pour permettre la survie de l'animal.

L'action pathogène du *Plasmodium*, que nous avons observée et qui a été également constatée par Blanchard et Langeron, est-elle due à une diminution de résistance des animaux vivant en cage sous un climat auquel ils ne sont pas adaptés?

Nous ne le pensons pas, car Halberstædter et Mayer par exemple ont étudié leurs hématozoaires non pathogènes à Hambourg où la température est encore plus basse qu'à Paris. D'ailleurs la maladie expérimentale n'a pas évolué chez nos singes dans les différents passages plus rapidement en hiver qu'en été.

Existe-t-il un renforcement de virulence de l'hématozoaire seulement dans les pays froids, et chez les singes n'ayant pas été infectés au préalable dans leur pays d'origine? La virulence du *Plasmodium* serait-elle normale dans les pays chauds chez certains animaux et a-t-elle simplement échappé aux observateurs? Nous penchons vers la première de ces hypothèses.

ESSAIS DE TRANSMISSION

A DES ANIMAUX AUTRES QUE LES SINGES

Nous avons déjà mentionné le cas des Lémuriens qui, bien que voisins des Primates, ne sont pas infectables par le *Plasmodium*.

Nos essais avec divers autres animaux ont été infructueux, comme l'avaient été ceux de différents auteurs qui ont expérimenté avec les *Plasmodium* de singes.

Nous avons suivi avec beaucoup d'attention, durant des temps jamais inférieurs à vingt jours, des cobayes, des rats, des souris blanches, des lapins, des paddas, des grenouilles, qui avaient

reçu des doses fortes de sang infecté. Jamais nous n'avons décelé le moindre parasite.

ACTION DE LA QUININE SUR L'INFECTION A PLASMODIUM

Il nous a paru intéressant de rechercher l'action des sels de quinine, spécifiques du paludisme humain, sur le développement et l'évolution du *Plasmodium* du singe.

QUININE A TITRE PRÉVENTIF. — Deux expériences ont été faites.

Les *Macacus cynomolgus* 818 et 847 reçoivent tous deux, au moment de l'inoculation d'un sang très parasité, et dans la cuisse opposée à celle qui sert à l'introduction du virus, une injection de chlorhydrate neutre de quinine : 7 centigrammes du sel pour le n° 818, pesant 900 grammes, et 12 centigr. 5 pour le n° 847 du poids de 1 kil. 300.

Très soigneusement examiné chaque jour pendant trois semaines, le *Cynomolgus* 818 ne présente jamais dans la circulation périphérique aucun *Plasmodium*. L'incubation de la maladie ne dépasse jamais, nous l'avons vu, onze jours. Le macaque doit être considéré comme n'ayant pas réagi. Un singe de même espèce, inoculé comme témoin, contracte une infection rapidement mortelle. Le *Cynomolgus* 818 n'est pourtant pas naturellement réfractaire : une nouvelle inoculation du virus détermina l'apparition du *Plasmodium* dans le sang dès le septième jour.

Le *Cynomolgus* 847, injecté préventivement avec la quinine le 5 mars et suivi vingt jours, ne présente jamais lui non plus de parasites. Mais il meurt prématurément, suivant toute vraisemblance d'ankylostomiase, peut-être d'intoxication médicamenteuse, et sa sensibilité au virus ne peut être éprouvée.

Dans ces deux expériences, l'action préventive de la quinine, à fortes doses, dans l'infection par le *Plasmodium*, nous paraît non douteuse.

QUININE A TITRE CURATIF. — La quinine administrée à titre curatif nous a paru au contraire d'une réelle inefficacité. Trois expériences ont été faites.

Exp. I. — Un *Cercopithecus patas*, pesant environ 3 kilogrammes, est inoculé le 12 août 1912, et présente le 19 de très nombreux parasites. On lui injecte dans les muscles de la cuisse 45 centigrammes de chlorhydrate neutre de quinine. L'examen, pratiqué deux heures et demie après, ne montre aucune modification ni dans le nombre, ni dans la morphologie des hématozoaires. Le lendemain matin, les parasites ont encore augmenté.

On pratique alors une nouvelle injection de 43 centigrammes de quinine ; les examens successifs faits d'heure en heure montrent qu'elle n'a pas plus d'effet que la première.

Le soir, on tente une injection intraveineuse du médicament. L'animal meurt pendant l'opération.

On peut assurer que l'animal arrivé au degré de parasitisme constaté ne pouvait survivre qu'un nombre limité d'heures. La quinine n'a eu aucune action sur le parasite.

Exp. II. — Le *Macacus cynomolgus* 332, pesant 0 kilog. 750, et montrant des parasites assez nombreux le 19 août, reçoit le 20 une injection intramusculaire de 15 centigrammes de chlorhydrate neutre de quinine. Moins d'une demi-heure après, l'animal présente des signes d'intoxication quinique : vertiges, étourdissements, et succombe le lendemain soir. Le nombre des *Plasmodium* n'a jamais diminué.

Dans cette expérience, les hématozoaires n'ont été nullement influencés par le médicament.

Exp. III. — Le *Macacus rhesus* 100, pesant 2 kilogr. 600, inoculé le 6 décembre 1912, et montrant des parasites assez nombreux le 18, reçoit ce jour-là une injection intramusculaire de 45 centigrammes de chlorhydrate de quinine. Les parasites restent assez nombreux les 19 et 20, sont rares le 21, et disparaissent du 23 au 26. On en revoit le 27, puis jusqu'à la mort de l'animal, le 31 décembre.

Il est difficile de préciser s'il y a eu action de la quinine ou simplement évolution normale de la maladie. Nous inclinons à croire que la disparition des hématozoaires n'a pas été sous la dépendance de l'injection médicamenteuse, mais que, la maladie du *Macacus rhesus* revêtant une allure chronique, nous avons assisté à une crise analogue à celles que nous avons appris à connaître. Les parasites ont d'ailleurs réapparu pour persister jusqu'à la mort.

L'infection à *Plasmodium* n'est nullement influencée par la quinine, et pourtant les doses injectées (15 à 20 centigrammes par kilogramme) sont excessivement élevées. Elles correspondraient, chez un homme du poids de 65 kilogrammes, à une dose de 11 à 12 grammes. Ces doses sont toxiques pour le singe comme elles le seraient pour l'homme. Elles semblent pourtant, la remarque est à faire, plus toxiques pour les singes porteurs d'hématozoaires que pour ceux traités à titre préventif.

Nos résultats diffèrent donc totalement de ceux publiés par Gonder et Rodenwaldt. Il est vrai que les expériences de ceux-ci ont été entreprises dans des conditions absolument dissimilaires des nôtres et avec un *Plasmodium* différent.

Sur des *Cercopithecus fuliginosus* infectés par *Plasmodium Kochi* et dont la rate avait été enlevée, Gonder et Rodenwaldt ont

constaté que la quinine agissait sans conteste sur l'infection sanguine. En donnant à intervalles rapprochés des doses faibles du médicament, ils sont même arrivés à des guérisons complètes.

INFLUENCE DE LA SPLÉNECTOMIE SUR L'ÉVOLUTION DU PLASMODIUM

Les auteurs ne sont pas d'accord sur les effets de l'extirpation de la rate au cours des infections dues à des protozoaires sanguicoles. L'organe splénique joue-t-il un rôle actif dans la défense de l'organisme, ou au contraire sert-il en quelque sorte de repaire aux hématozoaires pathogènes ?

Dans la *fièvre récurrente*, Metchnikoff (1) et Soudakevitch (2) sont d'avis que la destruction des spirilles se passe exclusivement dans la rate. Aussi, chez les sujets splénectomisés, la maladie doit-elle être rapidement mortelle. En effet, deux singes dératés inoculés par Soudakevitch moururent en peu de jours de spirillose aiguë, tandis que les lémoins présentèrent des infections bénignes. Pour Tictine (3), au contraire, l'extirpation de la rate reste sans effet.

Si Bradford et Plimmer (4), Sauerbeck (5) ont observé une évolution plus rapide du Nagana chez les animaux auxquels la rate est enlevée, il résulte par contre des expériences de Laveran et Mesnil (6), Laveran et Thiroux (7), Massaglia (8), que la splénectomie n'entraîne pas de modification sensible dans l'évolution des *trypanosomiasés* animales.

Dans le *paludisme*, Laveran (9) pense que la rate n'a aucun rôle de défense. « Les hématozoaires peuvent y vivre pendant longtemps à l'état latent. » L'extirpation de l'organe n'augmenterait pas la gravité de l'infection. Elle la diminuerait plutôt et Jonnesco a pu proposer la splénectomie comme traitement

(1) METCHNIKOFF, *Annales de l'Institut Pasteur*, 1890.

(2) SOUDAKEVITCH, *Annales de l'Institut Pasteur*, 1892, p. 545.

(3) TICTINE, *Revue médicale de Moscou*, 1894, t. X, p. 4.

(4) BRADFORD et PLIMMER, *Quat. J. of micr. Sc.*, 1902, t. XLV.

(5) SAUERBECK, *Zeitsch. f. Hyg.*, 1906, t. LII.

(6) LAVERAN et MESNIL, *Trypanosomes et trypanosomiasés*, 1904, p. 148.

(7) LAVERAN et THIROUX, Sur le rôle de la rate dans les trypanosomiasés, *Annales de l'Institut Pasteur*, 1907, t. XXI, p. 593.

(8) MASSAGLIA, Au sujet du rôle de la rate dans les trypanosomiasés, *Comptes rendus de l'Acad. des sciences*, 1907, p. 572.

(9) LAVERAN, *Traité du Paludisme*, 2^e édit., 1907, p. 396.

préventif de la cachexie palustre. De son côté, Hartmann (1) note que l'enlèvement de la rate ne met pas les malades à l'abri des rechutes de paludisme.

Chez un chien infecté avec *Piroplasma canis*, dans le sang duquel les parasites ne se retrouvaient plus depuis déjà quelque temps, Gonder et Rodenwaldt (2) ont vu l'extirpation de la rate suivie d'une réapparition de longue durée des hématozoaires. Les expériences de Ciuca (3) n'ont pas confirmé celles des auteurs allemands. Lorsque la maladie est à l'état chronique, la splénectomie dans la majorité des cas n'entraîne pas la réapparition des piroplasmes dans la circulation. Lorsque celle-ci se produit, elle est insignifiante, et comme nombre et comme durée, et peut être due au choc opératoire.

Nous avons recherché les effets de la splénectomie sur des singes infectés depuis des temps variables par le *Plasmodium*.

Des recherches identiques ont déjà été faites par Berenberg-Gossler et par Gonder et Rodenwaldt (2).

Le premier a pu enlever la rate à un *Cercocebus* au déclin de son infection par *Plasmodium Kochi* et amener une poussée durable de parasites dans la circulation périphérique.

Les seconds, après splénectomie, ont vu le *Plasmodium Kochi* qui était à l'état latent, pulluler dans le sang d'un *Cercocebus fuliginosus* et y persister durant des mois.

Berenberg-Gossler, comme Gonder et Rodenwaldt, ont vu chez leurs singes dératés des formes parasitaires dégénérées.

Les intéressants travaux de Xavier Bouniol sur la splénectomie de singes infectés par *Plasmodium cynomolgi* ont été reconstitués, après la mort du jeune expérimentateur, par Blanchard et Langeron.

L'extirpation de la rate a été pratiquée chez deux macaques.

L'un, inoculé le 1^{er} avril 1911, présenta une maladie chronique. Il n'avait vraisemblablement pas de parasites depuis plusieurs mois quand il fut splénectomisé en octobre 1911. A la suite de l'opération, les parasites pullulèrent dans le sang et l'animal mourut le mois suivant d'un « accès de paludisme aigu ».

(1) HARTMANN, Chirurgie de la rate. *Presse Médicale*, 1911, n° 78, p. 769.

(2) GONDER et RODENWALDT, *Centr. f. Bakt. I. Orig.*, 1910, t. LIV, p. 236.

(3) CIUCA, Recherches sur l'influence de la splénectomie totale sur l'évolution de la piroplasmose canine. *Bull. Soc. Pathologie exotique*, 1912, t. V, p. 142.

Le second macaque fut dératé avant de servir aux expériences. Inoculé à la mi-juillet 1944, les hématozoaires apparurent dans le sang une douzaine de jours plus tard et augmentèrent progressivement de nombre. Au début du mois d'août, il y eut une poussée de jeunes schizontes et de gamètes. L'observation devient alors lacunaire, pendant plusieurs semaines, par suite de la maladie de Bouniol. De la fin de septembre au commencement de novembre, les *Plasmodium* furent trouvés de façon constante et toujours en nombre assez élevé. Le macaque mourut dans le courant de novembre, quatre mois après l'inoculation. La maladie ne revêtit donc pas une allure aiguë.

Des modifications intéressantes dans la morphologie du *Plasmodium* ont été notées par Bouniol chez les animaux splénectomisés. Beaucoup de schizontes sont extrêmement amiboïdes. Il y a souvent un étirement curieux de la masse nucléaire avec formation de filaments chromatiques ondulés. Il y aurait aussi augmentation du nombre des mérozoïtes dans les parasites arrivés à maturité. Nous donnons ci-dessous les trois observations que nous avons relevées.

OBS. I. — Le *Macacus cynomolgus* 99, inoculé le 23 mai, après une incubation de neuf jours est trouvé porteur d'hématozoaires. Ceux-ci ne se montrent jamais très nombreux, et la maladie présente une série de rechutes. L'animal n'a eu aucun parasite du 41 au 16 juillet. Les hématozoaires réapparaissent les 17 et 18.

L'animal est alors splénectomisé. L'opération ne comporte aucune complication. Les *Plasmodium* augmentent en quantité de façon régulière jusqu'au 1^{er} août. Ils diminuent ensuite pour disparaître du 13 au 20 août, jour de la mort.

OBS. II. — Le *Cercopithecus cephus*, inoculé le 19 août, montre déjà d'assez nombreux parasites le 27. Ceux-ci restent nombreux jusqu'au 2 septembre, puis deviennent rares et intermittents jusqu'au 1^{er} octobre. On en rencontre quelques-uns du 7 au 12 de ce mois.

La splénectomie est pratiquée le 25 octobre. Les *Plasmodium* réapparaissent le 28 et augmentent en nombre jusqu'au 1^{er} novembre. Le singe meurt ce jour-là. L'autopsie permet de découvrir une poche purulente au niveau de l'emplacement de la rate. La péritonite doit être considérée comme cause de la mort.

OBS. III. — Le *Macacus nemestrinus*, inoculé le 4 décembre et infecté le 14, présente des parasites constamment et en nombre toujours restreint jusqu'au 8 janvier, puis de façon irrégulière et en très petit nombre jusqu'au 19 février. Les examens ultérieurs restent alors négatifs jusqu'au 9 mai.

La splénectomie est alors pratiquée. Le singe survit neuf jours, durant lesquels, à aucun moment, on ne rencontre de *Plasmodium* dans la circulation périphérique. La cause de la mort paraît imputable à une infection post-opératoire.

L'interprétation de ces expériences, dont le nombre n'est pas encore suffisant, prête à discussion.

Dans le premier cas, la splénectomie pratiquée le troisième jour d'une rechute n'a pas eu d'action directe sur celle-ci. Les parasites ont continué à augmenter progressivement, avant de diminuer et de disparaître. Le seul caractère un peu spécial, présenté par cette rechute, a été une longueur inaccoutumée.

Chez le second animal en expérience, l'opération a provoqué, trois jours après, l'apparition en grand nombre des parasites dans le sang. Dans les rechutes ordinaires, l'infection est toujours plus discrète. Mais il est difficile de dire le rôle qu'a joué, en affaiblissant l'organisme, la péritonite qui devait d'ailleurs enlever le cercopithèque (Cf. Ciuca).

Enfin la splénectomie chez le *M. nemestrinus*, opéré cinq mois environ après l'infection, paraît avoir été de nul effet. Les parasites n'ont pas réapparu dans la circulation périphérique. Il n'en est pas non plus trouvé à l'autopsie dans le sang du cœur et sur les frottis d'organes. Ils avaient peut-être complètement disparu.

Jamais, dans les divers examens de sang des deux premiers singes après la splénectomie, nous n'avons observé de modifications morphologiques du *Plasmodium* ni de différences dans la multiplication schizogonique de la masse nucléaire.

ESSAI DE CULTURE DU PLASMODIUM DES SINGES

En 1912, C. Bass (1) a annoncé avoir obtenu *in vitro* non seulement le développement complet d'une génération d'hématozoaires du paludisme, mais encore de véritables cultures en série. Il se sert de sang parasité simplement dextrosé et défibriné. Les repiquages réussissent quand les parasites sont transportés dans des milieux sanguins privés de leucocytes, fabriqués avec du sérum humain auquel on ajoute des hématies fraîches. La température optima est dans les environs de 40 degrés.

Peu après, en collaboration avec Johns (2), Bass a publié les

(1) C. BASS, Successful cultivation of Malarial Plasmodia. *J. of Amer. med. Assoc.*, 1912, t. LIX, p. 936.

(2) C. BASS et F. M. JOHNS, *J. of exper. Med.*, 1912, t. XVI, p. 567.

résultats positifs obtenus dans 29 cas de *Plasmodium præcox*, 6 cas de *Pl. vivax*, 1 cas de *Pl. malariae*.

Thomson et Mac Lellan (1), Lavinder (2), Ziemann (3) ont confirmé les dires de Bass en se servant de sa technique. Sinton (4) au contraire n'aurait pas obtenu une vraie culture de l'hématozoaire.

Dans une première expérience, nous nous sommes strictement conformés aux indications données par Bass dans son procédé pour une génération.

Les résultats sont nuls. Durant plusieurs jours, il est possible de mettre en évidence dans les hématies des parasites de petite taille, arrondis, à pigment assez abondant, mais jamais des hématozoaires en état de segmentation complète ou même avancée. A notre sens, les petites formes aperçues résultent de la contraction de schizontes adolescents ou adultes au stade initial de la division nucléaire, schizontes qui se trouvaient dans le sang du singe au moment du prélèvement.

Les hématozoaires persistent avec les mêmes caractères pendant cinq jours, le nombre en diminuant progressivement et la coloration devenant de plus en plus difficile.

Le *Plasmodium* du singe dans le milieu de Bass a donc montré une tendance manifeste à se condenser autour de son noyau, mais non à se développer.

Un second essai de culture est tenté. Les tubes de sang parasité, défibriné et dextrosé, sont placés les uns à 40 degrés, d'autres à 37 degrés, d'autres enfin laissés à la température du laboratoire (22 degrés environ).

Dans les tubes du premier lot, les hématozoaires se comportent comme dans la première expérience. Ils disparaissent en cinq jours.

Les phénomènes observés sont de même ordre avec le sang mis à 37 degrés, mais les phénomènes sont moins rapides.

Avec le sang laissé à la température du laboratoire, les résultats sont plus intéressants. Les *Plasmodium* sont retrouvés

(1) THOMSON et MAC LELLAN, *Ann. trop. Med. a. Paras.*, 1912, décembre, t. VI, p. 449.

(2) LAVINDER, *J. of Am. med. Assoc.*, 1913, t. LX, p. 42.

(3) ZIEMANN, *Deutsch. med. Wochens.*, février 1913, p. 373, et *Arch. f. Sch. u. Trop. Hyg.*, t. XVII, 1913, p. 361.

(4) SINTON, *Ann. trop. Med. a. Paras.*, 1912, t. VI, p. 371.

pendant dix-sept jours, du 4 au 21 février 1913; de plus, il y a un certain développement des hématozoaires.

Le sang, au moment de son prélèvement sur l'animal, contenait un très grand nombre de schizontes jeunes ou adolescents, quelques formes tout à fait au début de la segmentation et, *exceptionnellement*, des éléments à division à peu près complète à dix ou douze mérozoïtes.

L'examen pratiqué le 10 février, c'est-à-dire six jours après le début de l'expérience, nous montre au contraire un nombre appréciable de rosaces bien nettes à douze mérozoïtes, quelques-unes même en train de se rompre. Il y a aussi un très grand nombre de schizontes intraglobulaires d'une grande exiguité, tels qu'apparaissent les schizontes qui ont depuis peu envahi les globules sanguins.

Il y aurait donc eu, *in vitro*, sinon culture, du moins continuation de l'évolution du *Plasmodium*. Pour être autorisé à admettre la véritable culture de l'hématozoaire, il faudrait, par des repiquages successifs, continuer à produire le développement du parasite. Nous l'avons inutilement tenté. Le premier repiquage est déjà stérile.

L'interprétation des expériences est, avec le *Plasmodium* du singe, bien plus difficile qu'avec les hématozoaires du paludisme et en particulier *Plasmodium vivax*. Dans le premier cas, il y a toujours un certain nombre de générations coexistantes, à des âges divers, tandis que, dans le second, il est souvent possible de rencontrer une génération unique de parasites, dont toutes les formes sont, à un moment donné, à un même stade de développement.

La question de la culture du *Plasmodium* du singe est encore compliquée par le fait de la conservation facile du parasite, que nous avons observée, dans le sang lui-même ou dans l'eau citratée.

Plus de huit heures après la mort d'un singe parasité, le sang prélevé dans le cœur est encore infectieux, même à la dose de IV à V gouttes (cas du *Macacus sinicus* 16).

Le sang citraté mis à la glacière demeure virulent plusieurs jours. Le *M. cynomolgus* 69 fut inoculé avec succès le 8 février avec le sang d'un singe mort cinq jours auparavant.

Dans un autre cas, nous avons, à la glacière, conservé pendant

un mois du sang citraté contenant des *Plasmodium*. Des prélèvements; opérés tous les deux ou trois jours, nous ont toujours montré des hématozoaires prenant bien la coloration. Ajoutons cependant que le sang inoculé le huitième jour à un animal sensible ne réussit pas à l'infecter.

IDENTIFICATION DU PARASITE

Des quatre espèces connues de *Plasmodium* des singes, *Pl. Kochi* (Laveran, 1899), *Pl. pitheci* Halberstædter et Prowazek, 1907), *Pl. inui* (Halb. et Prow., 1907) (auquel nous rattachons *Pl. cynomolgi* Mayer) et *Pl. brasilianum* Gonder et Berenberg-Gossler, 1908), c'est à *Plasmodium inui* que nous identifions l'hématozoaire de *Macacus cynomolgus* que nous venons d'étudier.

Pl. Kochi, nommé par Laveran dans le livre jubilaire du cinquantenaire de la Société de Biologie, avait été vu par Koch chez un cercopithèque (*C. sabæus*) et revu peu après par Kossel chez un cynocéphale (*C. babuinus*). L'hématozoaire a été ensuite retrouvé par Sergent chez *Cercopithecus albogularis*, par Gonder et Berenberg-Gossler chez des *Cercocebus fuliginosus*, par Plimmer chez des *Cercopithecus sabæus* de Sierra-Leone et par Martoglio, Stella et Carpano chez la même espèce simiesque des hautes régions de l'Éthiopie. Les missions de la maladie du sommeil, en particulier les missions anglaises de l'Ouganda, ont souvent signalé des *Plasmodium* chez leurs singes d'expériences.

Plasmodium Kochi n'a jusqu'ici été rencontré que chez des singes d'Afrique. Il parasiterait les cercopithèques et les cynocéphales et aussi les *Cercocebus*, chez lesquels l'inoculation expérimentale réussit (Berenberg-Gossler).

L'évolution du parasite se fait entre vingt-quatre et cinquante heures. Les schizontes ressemblent à ceux de la tierce bénigne de l'homme; la schizogonie est toutefois complète à huit-quatorze mérozoïtes seulement. La cellule-hôte n'est pas hypertrophiée. Des grains de Schüffner ont été vus par Gonder et Berenberg-Gossler; ils n'ont pu être décelés que rarement ou pas du tout par d'autres observateurs.

Lühe a figuré un *Plasmodium* du chimpanzé, découvert par

Ziemann, qu'il a rapporté à *Pl. Kochi*; cette identification nous paraît au moins douteuse.

Le *Plasmodium pitheci* a été rencontré par Halberstædter et Prowazek chez des orangs-outangs (*Simia satyrus*) des Indes néerlandaises. P. Manson veut rapporter à cette espèce le *Plasmodium* du chimpanzé.

Les jeunes schizontes rappellent ceux de la tropicale. Le pigment est à grains gros et rares comme dans la quarte. Le cycle schizogonique est de quarante-huit heures, comme dans la tierce. L'hématie parasitée, non augmentée de volume, présente des granulations rappelant plus celles de Maurer que celles de Schüffner par leur irrégularité et leur grosseur inégale. Ces granulations n'existeraient pas, d'après Shibayama, chez le *Pl. pitheci* des orangs-outangs du Japon. L'inoculation, positive chez l'orang-outang, est négative chez les singes inférieurs.

Le *Plasmodium brasilianum* n'a encore été étudié que par Gonder et Berenberg-Gossler chez un *Brachyurus calvus*, originaire des rives de l'Amazonie, et en Allemagne depuis longtemps. L'hématozoaire ressemble beaucoup, morphologiquement, au *Plasmodium malarie* (quarte) et son évolution s'opère en soixante-douze heures. Il n'y a ni hypertrophie du globule ni granulations de Schüffner.

Sous le nom de *Plasmodium inui*, Halberstædter et Prowazek ont décrit en 1907 un hématozoaire pigmenté rencontré dans le sang de *Macacus cynomolgus* et *M. nemestrinus*. Son évolution est de quarante-huit heures. La schizogonie aboutit à la formation de 12-16 mérozoïtes. Les globules parasités, non augmentés de volume, ne possèdent pas de granulations de Schüffner.

Presque en même temps, Martin Mayer a appelé *Pl. cynomolgi* le parasite qu'il a trouvé à Hambourg chez un *Macacus cynomolgus* provenant de Java. Le cycle schizogonique est de quarante-huit heures; il y a 8-13 mérozoïtes. La morphologie est celle du précédent, mais le pigment est à grains gros et peu nombreux au lieu d'être abondant et très fin. Mayer a réussi à mettre en évidence des granulations de Schüffner. Le *Pl. cynomolgi* est inoculable aux macaques et aux cercopithèques.

Dès 1907, Mesnil, d'après la description des auteurs et l'exa-

men des figures publiées, croit à l'identité de *Plasmodium inui* et de *Pl. cynomolgi*.

Berenberg-Gossler en 1909 exprime le même avis. C. Mathis et M. Leger en 1911, à propos de leur parasite de *M. rhesus* et *M. lasiotis tcheliensis*, soutiennent la même opinion.

Blanchard et Langeron admettent au contraire que *Plasmodium cynomolgi* Mayer est « une bonne espèce, bien distincte », et y rattachent leur hématozoaire de *M. cynomolgus*.

Il est indéniable que *Pl. inui* et *Pl. cynomolgi*, dont le cycle évolutif est de durée égale, présentent les plus grandes ressemblances morphologiques : seules la grosseur et l'abondance des grains de pigment ne seraient pas les mêmes. Mais les granulations de Schüffner, décelées dans les globules rouges envahis par *Plasmodium cynomolgi*, n'ont pas été signalées dans le cas du *Pl. inui*.

C'est principalement sur cette altération de la cellule-hôte parasitée que Blanchard et Langeron s'appuient pour exprimer l'avis que la coupure spécifique s'impose. La présence de granulations de Schüffner aurait, à leur sens, une valeur systématique plus importante que des détails morphologiques tels que le nombre des mérozoïtes, et ils insistent surtout sur le cas du *Pl. vivax* de l'homme.

Dans l'infection par *Pl. cynomolgi*, les granulations de Schüffner sont constantes d'après Blanchard et Langeron, qui se sont servis avec avantage du panchrome de Pappenheim. « Si on ne les voit pas, c'est qu'on n'a pu les colorer par suite d'un accident quelconque (ancienneté des frottis, faute de technique) ».

C'est cet « accident » qui a dû arriver, et par intermittence, à tous les observateurs qui ont jusqu'à présent coloré les *Plasmodium* de macaques. C'est probablement aussi d'ailleurs cet accident qui a empêché Halberstädter et Prowazek de mettre en évidence des granulations de Schüffner dans les globules rouges du singe porteur de *Pl. inui*, et, d'après cette remarque, on devrait conclure à l'identité des deux espèces, même en supposant la constance des granulations.

M. Mayer spécifie que les cellules-hôtes à granulations de Schüffner ne sont pas chez tous les animaux en nombre toujours aussi grand.

C. Mathis et M. Leger font la remarque que l'altération globulaire n'est pas toujours décelée. Le nombre considérable de frottis qu'ils ont examinés leur a permis de dire que la mise en évidence du pointillé caractéristique tient beaucoup au colorant. Avec le Giemsa, additionné ou non de carbonate de potasse et de bleu azur, ils n'ont jamais rien obtenu; avec le Leishman, les granulations sont souvent visibles, mais pas toujours, sans qu'ils puissent expliquer la cause du succès ou de l'insuccès.

Dans les autres espèces de *Plasmodium* des singes, l'inconstance de l'altération globulaire est également notée. Le *Pl. pitheci* décrit par Halberstædter et Prowazek la possède; le *Pl. pitheci* vu au Japon par Shibayama ne l'a pas. *Plasmodium Kochi* ne comporte d'ordinaire pas de granulations de Schüffner. Gonder et Berenberg-Gossler en ont pourtant décelé chez un *Cercocebus fuliginosus* infecté expérimentalement.

Dans les infections à *Plasmodium* de l'homme, on ne peut s'appuyer uniquement sur la présence ou l'absence des granulations protoplasmiques de la cellule parasitée pour admettre trois espèces absolument distinctes d'hématozoaires du paludisme.

Les granulations de Schüffner coexistent, il est vrai, de façon à peu près constante avec *Plasmodium vivax*, mais les mouchetures ou taches de Maurer font souvent défaut dans l'infection par *Pl. præcox*. Nous avons remarqué que, dans certains cas, ces mouchetures se colorent avec la plus grande facilité, même par le simple Giemsa à 1 p. 40, tandis que, dans d'autres cas, on a le droit de conclure à leur inexistence, puisque, même par les procédés spéciaux (tel celui de Billet comportant l'addition de solution alcaline et la coloration à chaud), on n'arrive pas à les déceler. Le même jour, opérant dans des conditions identiques, on a une série de lames d'un malade, qui toutes montrent l'altération globulaire, tandis que la série d'un autre paludéen, également porteur de *Pl. præcox*, n'en montre pas. Bouffard (communication orale) a fait des remarques du même genre.

N'attachant pas, dans les infections à *Plasmodium* des singes, une importance spécifique à la présence des granulations de Schüffner, l'altération globulaire ne dépendant pas uniquement du parasite, nous identifions le parasite que nous avons étudié

à *Plasmodium inui*, de même que nous rattachons à celui-ci *Plasmodium cynomolgi*. Chez nos singes, les granulations de Schüffner étaient inconstantes. Elles n'existaient que dans le sang de certains singes et certains jours seulement. Un animal splénectomisé en a montré tout particulièrement.

L'action pathogène du parasite est très spéciale, mais n'autorise cependant pas à créer une espèce nouvelle.

BIBLIOGRAPHIE

H. BERENBERG-GOSSLER. — Beiträge zur Naturgeschichte der Malariaplasmodien. *Arch. f. Protist.*, 1909, t. XVI, p. 246.

R. BLANCHARD et M. LANGERON. — Le Paludisme des Macaques (*Plasmodium cynomolgi* Mayer, 1907). *Arch. Parasitologie*, 1912, t. XV, p. 529.

— Nouvelles recherches sur le Paludisme des Macaques (d'après les notes posthumes de Xavier Bouniol). *Arch. Parasitologie*, 1912, t. XV, p. 599.

M. BOUILLIEZ. — Nouvelles recherches expérimentales sur un *Plasmodium* des singes. *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, 1913, t. LXXIV, p. 1070.

P. C. FLU. — Untersuchungen über Affenmalaria. *Arch. f. Protistenk.*, 1908, t. XII, p. 320.

R. GONDER et BERENBERG-GOSSLER. — Untersuchungen über Malariaplasmodien der Affen. *Malaria*, 1908, t. I, p. 47.

R. GONDER et E. RODENWALDT. — Experimentelle Untersuchungen über Affenmalaria. *Centr. f. Bakt.*, I, Orig., 1910, t. LIV, p. 236.

L. HALBERSTAEDTER et S. PROWAZEK. — Untersuchungen über Malariaparasiten der Affen. *Arb. a. d. kais. Gesundheitsamte*, 1907, t. XXVI, p. 37.

KOSSEL. — Über einen Malaria ähnlichen Blutparasiten beim Affen. *Zeit. f. Hyg.*, 1899, t. XXXII.

A. LAVERAN. — Cinquantenaire de la Société de Biologie. *Livre jubilaire*, 1899, p. 127.

M. LEGER et M. BOUILLIEZ. — Sur un *Plasmodium* des singes. Passages par espèces variées. Action pathogène. *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, 1912, t. LXXIII, p. 310.

LÜHE, in C. MENSE. — *Handbuch der Tropenkrankheiten*, t. III, p. 223.

E. MARCHOUX in GRALL et CLARAC. — *Traité de Pathologie exotique*, t. I, p. 123.

MARTOGGIO, STELLA et CARPANO. — Su un plasmodio della scimia. *Ann. Ig. sper.*, t. XX, p. 287.

C. MATHIS et M. LEGER. — Plasmodium des macaques du Tonkin. *Annales Institut Pasteur*, 1911, t. XXV, p. 593.

— *Recherches de Parasitologie et de Pathologie humaines et animales au Tonkin*, 1911. Masson, Paris, p. 247-264.

M. MAYER. — Ueber Malaria beim Affen. *Mediz. Klinik*, 1907, n° 20.

— Ueber Malariaparasiten bei Affen. *Arch. f. Protist.*, 1908, t. XII, p. 314.

F. MESNIL. — Analyses in *Bulletin Institut Pasteur*, 1907, 1908, 1910, 1912.

H. PLIMMER. — On the Blood Parasites found in animals in the zoological Gardens. *Proc. Zool. Soc. of London*, 1912.

ED. SERGENT. — Un cas de réveil d'infection à hémocytozoaires chez un singe. *Bull. Soc. Path. exotique*, 1908, t. I, p. 187.

G. SHIBAYAMA. — On Malaria parasites of the Orang-Outang. *The Philippine J. of Sc.*, 1910, t. V, p. 185.

OBSERVATIONS SUR L'ICHTHYOSPORIDIUM ET SUR LA MALADIE QU'IL PROVOQUE CHEZ LA TRUITE

PAR AUGUSTE PETTIT.

(Avec les planches XIII et XIV.)

(Travail du laboratoire de M. A. LAVERAN.)

AVANT-PROPOS

Au début de l'été de 1910, un pisciculteur français constatait qu'une mortalité de plus en plus élevée décimait ses élevages de Truites (*S. irideus* Gibbons et *S. fontinalis* Mitchell) (1) ; alarmé par cette situation, il demanda conseil au secrétaire général de la Société d'Aquiculture, le D^r J. Pellegrin, qui me l'adressa.

Sans tarder, je me fis envoyer des matériaux d'études. Des recherches poursuivies avec A. Laveran (2), établirent que la mortalité des Truites en question était due à une affection parasitaire décrite, en 1893, par B. Hofer, sous le nom de *Taumelkrankheit* ou maladie du vertige. Mais cette appellation implique l'existence d'un symptôme accessoire qui peut faire complètement défaut : d'autre part, l'agent producteur de cette maladie, pour les raisons exposées ci-après, doit prendre place dans le genre *Ichthyosporidium* de M. Caullery et F. Mesnil ; il est donc conforme aux usages actuels de désigner la maladie en question sous le nom d'ichthyosporidiose.

Autant que les circonstances l'ont permis, je me suis efforcé de poursuivre l'étude de cette affection, mais, de très nombreuses lacunes subsistent encore dans l'histoire du parasite :

(1) Peut-être regrettera-t-on de ne pas trouver ici l'indication de l'établissement où a sévi l'épizootie en question ; mais sur la demande formelle du propriétaire, je ne puis donner ce renseignement.

(2) Les résultats de ces recherches, résumés dans une note présentée à l'Académie des Sciences (voir bibliographie), sont exposés plus complètement dans le présent mémoire.

néanmoins, je me décide à faire connaître les résultats obtenus, car je n'entrevois plus la possibilité d'obtenir de nouveaux matériaux.

L'ichthyosporidiose des Truites de viviers n'a encore été signalée qu'à de rares reprises : tout d'abord, par B. Hofer en Allemagne (1893), par A. Laveran et A. Pettit en France (1910), enfin par M. Plehn et K. Mulsow en Allemagne (1911).

La symptomatologie de l'affection serait assez caractéristique, d'après B. Hofer ; il existerait, notamment, une période au cours de laquelle les poissons infectés présenteraient de l'incoordination des mouvements ; mais, c'est là un phénomène inconstant, qui peut n'apparaître qu'aux approches de la mort ou même faire complètement défaut. Pour ma part, je ne l'ai jamais constaté ; chez les Truites conservées en aquarium pendant un laps de temps variable, l'ichthyosporidiose a toujours évolué de façon insidieuse et ce n'est qu'à la phase ultime de la maladie que l'animal présente des signes de souffrance ; encore n'offre-t-il d'autres symptômes que ceux d'un épuisement général.

Toutefois, l'examen microscopique des fèces permet de dépister l'ichthyosporidiose longtemps avant que l'infection affecte l'état général ; en effet, les matières excrémentitielles renferment fréquemment des formes jeunes du parasite (1) ; d'ailleurs, ce signe ne comporte pas un pronostic fatal ; certains poissons guérissent après avoir présenté des fèces infectées.

I

STRUCTURE DU PARASITE

Dans le corps de la Truite, l'*Ichthyosporidium* revêt deux aspects principaux, celui de kystes et celui de sphérules.

1° KYSTES.

La forme la plus fréquente sous laquelle le parasite se présente dans les tissus est celle d'un kyste arrondi (fig. 1, 2, 3,

(1) Voir page 991.

4, 5), de dimensions variables, pouvant atteindre un diamètre de 200 μ ; on y distingue une capsule et un cytoplasma.

A. Capsule. — Complètement développé, le kyste est renfermé dans une capsule épaisse, translucide, qui se décompose plus ou moins nettement en deux parties.

La dualité de cette membrane est particulièrement évidente dans certaines conditions, notamment lorsque le kyste est rompu et que le cytoplasma fait hernie au dehors; dans ce cas, la couche externe demeure en place, au sein des tissus, tandis que l'interne est entraînée par le cytoplasma, auquel elle reste adhérente (fig. 3, 4).

A l'état frais, la capsule du kyste paraît anhiste; au contraire, sur les coupes, les deux couches se teignent différemment; dans la méthode hématoxyline au fer-éosine-orange, l'externe se colore en noir et l'interne en orange; après emploi de l'éosine-bleu de méthyle (méthode de Chatton), l'externe est rouge et l'interne bleue; enfin, le magenta picro-indigo-carmin communique une teinte rouge pâle à l'externe et une teinte vert-bleue à l'interne.

On note également des différences au point de vue de la structure : l'externe est mince, réfringente et lamelleuse; l'interne est beaucoup moins dense et pluristratifiée.

Au point de vue histo-chimique, A. Laveran et A. Pettit s'étaient bornés à indiquer que la membrane kystique possédait certaines des propriétés de la callose. L'examen, auquel le D^r Pinoy a bien voulu procéder, fournit les résultats suivants : la membrane interne se colore en brun sous l'influence de la vésuvine en milieu acide; la membrane externe offre une réaction comparable à celle des tissus environnants de l'hôte. Il est donc rationnel de considérer la membrane interne comme formée de cutine, l'externe possédant un stroma de même nature, modifié par les liquides organiques.

Il est à noter, d'ailleurs, que les éléments anatomiques de l'hôte présentent des affinités chromatiques entièrement différentes; même en faisant abstraction de leurs caractères morphologiques, on ne saurait donc les confondre avec des formations émanées du parasite.

B. Cytoplasma. — A l'état frais, le cytoplasma est parsemé de globules de graisse (fig. 3, 4), dont la proportion augmente avec l'âge; dans les kystes ayant atteint leur complet développement, ils font obstacle à l'emploi des fixateurs osmiques : sous l'influence de ceux-ci, le parasite prend une coloration noire qui masque tous les détails et qu'il est à peu près impossible de faire disparaître sans altérer la structure; force est donc de recourir aux fixateurs tels que les mélanges au sublimé, au picro-formol, etc...

L'application à l'état frais des colorants usuels ne fournit pas de bons résultats; exception faite du vert de méthyle, on n'obtient ainsi qu'une coloration diffuse. Les frottis fixés après demi-dessiccation ne sont guère plus instructifs; toutefois, les parasites, à condition qu'ils soient de très petites dimensions, se colorent de façon satisfaisante par l'hématoxyline-éosine-orange. Mais, de façon générale, l'étude du cytoplasma ne peut-être fructueusement poursuivie que sur des coupes.

Dans ces conditions, le cytoplasma affecte une structure aréolaire (fig. 6); l'extraction de la graisse y crée des vides considérables (fig. 4, 6); en outre, les trabécules qui limitent ceux-ci sont eux-mêmes formés de fibrilles dessinant un réseau irrégulier.

Telle est la structure de beaucoup la plus habituelle, mais il faut signaler un autre aspect qui paraît en rapport avec les karyokinèses. En effet, lorsque les noyaux entrent en mitoses, le cytoplasma (sur les coupes colorées) se modifie : il devient homogène, plus chromophile et plus réfringent; il se craquèle de façon à rappeler l'apparence de la colloïde dans les vésicules thyroïdiennes (fig. 7). Il est à noter que quand les karyokinèses ne s'étendent pas à tout le cytoplasma, les modifications susindiquées ne s'observent que dans la zone renfermant des noyaux en voie de division (fig. 6). Remarquons cependant que cette transformation n'est pas une condition indispensable de la mitose, car celle-ci s'observe aussi au sein du cytoplasma aréolaire.

C. Capillitium. — Un certain nombre de kystes renferment des trabécules, d'épaisseur variable, réfringents, chromophiles, anastomosés entre eux de façon à dessiner au sein du cyto-

plasma un réseau irrégulier et lâche. Cette formation peut s'observer dans la plupart des kystes d'une même Truite alors qu'on la rechercherait en vain sur un nombre relativement élevé d'autres poissons de même espèce; dans les cas où je l'ai constatée, sa présence coïncidait avec l'existence de mitoses. A s'en rapporter à un juge autorisé, le D^r Pinoy, ce réseau présente tous les caractères d'un capillitium (fig. 7).

B. Noyau. — Le cytoplasma est parsemé, dans sa totalité, de noyaux ne dépassant guère 2 μ de diamètre. Dans certains cas, ceux-ci se réduisent à une massette de chromatine; mais, en général, le grain de chromatine est arrondi et renfermé dans une capsule acidophile; entre ces deux formations, il existe un espace libre qui reste incolore sur les pièces correctement colorées et qui doit être occupé à l'état vivant par du suc nucléaire (fig. 4, 6).

Les noyaux en question se multiplient par mitoses, se produisant par poussées. Après être resté assez longtemps sans trouver de noyaux en division indirecte, j'ai observé tout à coup des poissons dont la plupart des parasites, complètement développés, présentaient des karyokinèses souvent extrêmement nombreuses.

Les figures karyokinétiques sont de dimension exiguë et il ne m'a pas été possible de déceler un système achromatique net; elles s'effectuent suivant le schéma déjà indiqué par M. Caullery et F. Mesnil, puis par M. Robertson.

Tout d'abord, le karyosome change de forme; d'arrondi, il devient anguleux, puis ne tarde pas à se fragmenter en un nombre variable de massettes de chromatine irrégulières et inégales; la capsule acidophile s'atténue et souvent même disparaît; la chromatine s'ordonne alors en figures bipolaires plus ou moins nettes; dans les cas les plus caractéristiques, on distingue une plaque équatoriale, puis deux autres qui se séparent ultérieurement.

2° KYSTES ROMPUS.

Jusqu'ici, il n'a été question que de kystes renfermés dans une capsule intacte, mais, fréquemment, celle-ci se rompt et.

par l'orifice ainsi créé, le cytoplasma fait hernie au dehors et se répand dans le milieu extérieur (fig. 4). Ce phénomène se produit dans les conditions les plus diverses aussi bien au sein des tissus de la Truite fixés immédiatement après la mort que dans les fragments de tissu abandonnés à eux-mêmes ou conservés dans l'eau de conduite, dans le sérum artificiel, dans le bouillon, etc...

Comme B. Hofer l'a indiqué dès 1893, le cytoplasma émigré hors de sa capsule se ramifie à la façon d'un thalle et peut donner naissance à des kystes secondaires qui reproduisent, aux dimensions près, la structure des éléments dont ils dérivent.

Les capsules ainsi vidées de leur contenu (fig. 3) résistent longtemps à l'action des tissus de l'hôte; elles se remplissent, tout d'abord, de leucocytes et de cellules conjonctives, auxquels se substitue ultérieurement du tissu de sclérose, ainsi que l'a figuré M. Robertson.

3° SPHÉRULES.

Dans le corps de la Truite, l'*Ichthyosporidium* peut encore affecter un autre aspect, celui de sphérules de 15 μ de diamètre environ (fig. 8, 9).

Ces corpuscules s'observent à l'intérieur du cœlome et dans l'épaisseur des tissus, en très petit nombre; dans le tube digestif, avec une extrême abondance parfois; enfin, dans les fèces de la plupart des poissons infectés, avec une fréquence variable.

Les sphérules sont assez régulièrement arrondies; elles sont munies d'une capsule mince, réfringente, peu ou pas perméable, abritant un cytoplasma riche en graisse.

Après fixation et coloration, on décèle un noyau excentrique, formé d'un karyosome sphérique renfermé dans une capsule acidophile.

II

DÉVELOPPEMENT DU PARASITE

L'examen des Truites ayant succombé à l'ichthyosporidiose est insuffisant pour établir l'évolution du parasite; cette condition défavorable tient à ce que, pour un poisson donné, la plupart des *Ichthyosporidium* réalisent des stades voisins et surtout à ce que, à la mort de l'hôte, les divers parenchymes organiques ne renferment guère d'autres formes que des kystes complètement développés.

J'ai été ainsi amené à tenter des infections expérimentales chez la Truite arc-en-ciel (*S. irideus*), la Carpe (*C. carpio* L.), la Tanche (*Tinca vulgaris* Cuv.), la Perche (*Perca fluviatilis* Rond.), la Grenouille (*R. esculenta* L. et *R. temporaria* L.), le Crapaud (*B. vulgaris* Laur.) et l'Ecrevisse (*B. fluviatilis* Rond.) (1).

Pour ces recherches, les poissons neufs étaient naturellement examinés avant toute inoculation; quant aux Truites (*S. irideus*), elles provenaient d'un établissement piscicole situé dans une région de France très éloignée de celle où se trouvaient les viviers contaminés.

Faute de matériel convenable, les expériences n'ont pas été aussi nombreuses qu'il eût été souhaitable.

Tout d'abord, je me suis préoccupé de rechercher ce que deviennent les kystes à l'intérieur du corps de la Truite. A cet effet, deux de ces poissons sont inoculés sous la peau.

Obs. I et II. — Deux Truites, inoculées sous la peau avec une émulsion de foie de truite riche en kystes, meurent trois et quatre jours après, d'un vaste abcès déterminé par l'injection; le pus renferme des kystes non modifiés et quelques kystes vides de leur contenu.

Devant ce résultat négatif, j'ai eu recours à la voie intracœlomique :

Obs. III. — Truite inoculée dans le cœlome avec une émulsion de foie de truite riche en kystes; meurt quatre jours après; quelques taches hémorragiques éparses sur le péritoine, au niveau desquelles on observe des

(1) La Grenouille, le Crapaud et l'Ecrevisse sont réfractaires au virus de l'ichthyosporidiose.

kystes vides, des kystes pleins et des formes de petite taille non enkystées.

Obs. IV. — Truite inoculée dans le cœlome avec une émulsion de foie de truite riche en kystes; meurt onze jours après d'infection microbienne; quelques kystes au niveau du péritoine.

Obs. V. — Truite inoculée dans le cœlome avec une émulsion de foie de truite riche en kystes; meurt sept jours après. La graisse des appendices pyloriques, l'œsophage (face péritonéale), le cœur, le foie et le péritoine (au voisinage des reins) présentent des taches hémorragiques; cet aspect est dû à la formation de tissu de granulation englobant un ou plusieurs kystes de dimensions variables; on observe notamment un grand nombre de petits éléments; dans quelques préparations, on constate l'émission, par de gros kystes, de kystes secondaires jeunes.

Obs. VI. — Truite inoculée dans le cœlome avec une émulsion de foie de truite riche en kystes; paraît se porter parfaitement; meurt brusquement 16 jours après. Le péritoine présente un certain nombre de petites taches noires de 0,5 à 1 millimètre de diamètre.

Les taches en question sont formées de pigment brun, de kystes vides, de kystes pleins, dont certains renferment des kystes secondaires et dont d'autres émettent des prolongements en forme de thalle.

Obs. VII. — Truite inoculée dans le cœlome avec une émulsion de foie de truite riche en kystes; meurt vingt-cinq jours après; le péritoine renferme un exsudat assez abondant avec hématies, cellules endothéliales, kystes pleins et vides, nombreux.

Au niveau du tissu adipo-pancréatique qui s'insinue entre les appendices pyloriques, petites taches hémorragiques; foie hypertrophié avec taches hémorragiques; sur la face cœlomique de l'estomac, kystes volumineux; cœur flasque, hérissé de nodules blancs; le liquide de la vésicule biliaire renferme trois kystes.

Il ressort des observations précédentes (III-VII) que, peu de temps après l'inoculation intrapéritonéale, la plupart des kystes se vident et que le cytoplasma se répand au dehors; d'autre part, on voit apparaître des formes de petite taille qui se disséminent dans la cavité cœlomique et qui vont se multiplier à leur tour dans les divers organes, en particulier dans la graisse interpylorique et à la surface externe du cœur.

Si l'exode du cytoplasma hors de sa capsule constitue le premier temps de la propagation de l'*Ichthyosporidium*, il faut néanmoins se rappeler que ce phénomène se produit également dans les conditions les plus banales; on l'observe même chez les animaux réfractaires au virus (fig. 10):

Obs. VIII, IX et X. — Trois Crapauds sont inoculés dans le cœlome avec une émulsion de foie de Truite riche en kystes; deux meurent d'infection quatre et sept jours après; le dernier est sacrifié à l'agonie; chez les trois animaux, le produit injecté est englobé dans une masse brunâtre ayant la constitution d'un bourgeon charnu; la très grande majorité des kystes sont

vides de cytoplasma et bon nombre sont remplis par des leucocytes et des cellules conjonctives; quelques-uns renferment des kystes secondaires.

La possibilité pour l'*Ichthyosporidium* de se multiplier dans le cœlome de la Truite ayant été établie, j'ai cherché à transmettre l'ichthyosporidiose par des procédés imités de ceux qui sont naturellement réalisés. A cet effet, des Truites reçoivent par la bouche des viscères riches en kystes :

Obs. XI. — Truite mange des viscères riches en *Ichthyosporidium*; meurt trois jours après; l'estomac renferme des capsules de kystes vides et de très nombreux kystes de petite dimension; on retrouve un certain nombre de ces derniers dans la profondeur des cryptes glandulaires.

Obs. XII. — Truite mange des viscères riches en *Ichthyosporidium*; meurt onze jours après.

Le tube digestif renferme quelques kystes de 25 à 30 μ . de diamètre, à l'exclusion de sphérules. Nombreux kystes dans le foie, sur le cœur, dans la graisse des appendices pyloriques. La tunique stomacale renferme une certaine proportion de kystes; tous sont de petites dimensions; ils siègent à tous les niveaux, mais spécialement dans les portions superficielles de la muqueuse. Les uns se développent dans le fond des acini, dont ils repoussent les cellules sécrétantes; les autres évoluent dans l'épaisseur du stroma des villosités, qui se renfle ainsi en une sorte de bilboquet. En outre, on observe d'autres kystes au-dessous de la muqueuse, en pleine tunique musculaire et dans la séreuse qu'ils effondrent pour se répandre dans le cœlome. Les appendices pyloriques et, plus rarement l'intestin, offrent des images analogues.

Obs. XIII. — Truite mange des viscères riches en *Ichthyosporidium*; 52 jours après, j'observe des sphérules dans les fèces; vingt-deux jours après cette constatation, je sacrifie la Truite; des sphérules très rares dans le mucus stomacal et dans l'intestin; quelques kystes en karyokinèse dans l'estomac; de nombreux kystes de 20 à 100 μ . de diamètre dans le foie, entre les appendices pyloriques et à la surface de la vessie nataoire; dans la musculature du tube digestif des kystes assez peu nombreux; quelques-uns effondrent la séreuse et se répandent dans le cœlome. La graisse qui entoure l'intestin est riche en kystes.

Obs. XIV. — Truite mange des viscères riches en *Ichthyosporidium*; 52 jours après, une sonde ramène de l'estomac de nombreuses sphérules de 10 à 25 μ . de diamètre ainsi que des kystes jeunes encapsulés.

Le lendemain la truite est sacrifiée. Pas de kystes dans les divers parenchymes organiques. Examiné sur frottis colorés, le mucus stomacal se montre riche en formes jeunes; on remarque notamment des masses de contour irrégulier, mesurant environ 12 μ . de large, munis de noyaux en karyokinèse. Ces masses se transforment en de jeunes kystes ayant un diamètre d'environ 15 μ .

Obs. XV. — Tanche ayant mangé des viscères riches en *Ichthyosporidium* et cohabitant avec des Truites infectées; meurt six mois après.

Pas de parasites dans le tube digestif. Des kystes dans le foie et sur la face cœlomique de l'intestin.

Obs. XVI. — Perche, cohabitant avec des Truites infectées et ayant mangé des viscères renfermant des *Ichthyosporidium*, meurt six mois après.

Foie décoloré farci de perles blanches; des kystes sur le tube digestif et sur le cœur. Le cœlome renferme un liquide sanguinolent tenant en suspension quelques kystes petits.

La lumière du tube digestif, depuis le cardia jusqu'à l'anus, renferme des sphérules et des petits kystes nombreux. Les sphérules sont surtout comprises dans le mucus qui adhère aux cellules, mais quelques-unes ont pénétré au-dessous du revêtement épithélial. Le stroma conjonctif des villosités est gonflé par des kystes assez volumineux ou des amas de kystes serrés les uns contre les autres et de volume assez variable; les plus petits ne possèdent qu'un ou deux noyaux. Souvent ils sont groupés autour d'une volumineuse enveloppe kystique complètement vide ou renfermant encore un petit nombre de kystes secondaires.

La musculature et la séreuse renferment également des kystes.

Les tuniques intestinales offrent de très nombreux kystes reproduisant très exactement les processus décrits au niveau de l'estomac.

Une proportion élevée de kystes est le siège de karyokinèses abondantes.

Obs. XVII. — Perche traitée comme la Perche XVI; meurt huit mois après.

Kystes nombreux dans la foie, la rate, le cœur et la plupart des autres organes.

Obs. XVIII. — Cinq Perches, traitées comme XVI, sont sacrifiées au bout de sept mois; deux présentent des kystes dans le foie.

Ainsi, dans l'estomac, les kystes se rompent rapidement, se multiplient dans le mucus stomacal et donnent naissance à de petits éléments (fig. 11); l'infection évolue assez rapidement et, au bout d'une dizaine de jours, les *Ichthyosporidium* pénètrent dans les divers organes splanchniques. Lorsque le poisson a une survie assez longue, on voit apparaître dans le foie des sphérules qu'on peut retrouver dans les cavités intestinale et surtout stomacale. A ce niveau, les sphérules sont assez nombreuses pour former des taches blanches visibles à l'œil nu. Si l'on pratique des coupes au niveau des amas en question, on constate que la plupart gisent dans le mucus au voisinage de la face libre des cellules (fig. 8); un petit nombre, cependant, occupent la lumière des glandes et d'autres, encore plus rares, se sont insinuées entre les cellules épithéliales.

Je n'ai pu saisir sur le vif le mode de formation des sphérules; mais, tout semble indiquer, notamment l'expérience XIX, que celles-ci dérivent des kystes, à la façon d'une spore de myxomycète :

Obs. XIX. — Truite ayant mangé une certaine quantité de foie riche en kystes; 28 jours après, les fèces renferment des sphérules qui persistent

peu nombreuses pendant 6 jours; ce poisson meurt 159 jours après l'ingestion de kystes; pas la moindre trace du parasite à la nécropsie.

D'autre part, il convenait de rechercher, au point de vue de la transmission de l'ichthyosporidiose, l'effet de la cohabitation. A cet effet, plusieurs Truites et Carpes sont maintenues dans un aquarium renfermant des sujets infectés; une Truite et une Carpe fournissent seules des résultats concluants.

Obs. XX. — Truite maintenue dans le même aquarium que des Truites infectées, meurt au bout de 10 jours; le mucus stomacal renferme des grumeaux blancs; ceux-ci sont formés de sphérules de 10-12 μ de diamètre; quelques parasites dans la cavité péritonéale et dans divers organes splanchniques.

Obs. XXI. — Carpe, ayant cohabité avec des Truites infectées, meurt 64 jours après; des kystes dans l'intestin et dans le foie.

Ainsi ces deux poissons (XX et XXI) ont contracté l'ichthyosporidiose à la suite de la cohabitation avec des sujets infectés; toutes les précautions nécessaires ont été prises pour éviter l'ingestion de fragments de cadavres; la contagion est donc assurée par les sphérules rejetées avec les fèces. Cette opinion est corroborée par l'observation suivante :

Obs. XXII. — Truite neuve reçoit par le moyen d'une sonde stomacale des fèces riches en sphérules.

24 heures après, une sonde stomacale ramène des sphérules inchangées; 48 heures après, même résultat; 96 heures après l'injection, nouveau sondage : au milieu des sphérules, des kystes jeunes non rares; 24 heures après cette constatation, la Truite est sacrifiée : la cavité stomacale renferme de très nombreuses sphérules et des kystes plus abondants que la veille.

Il résulte de cette observation, d'ailleurs confirmée par de nombreuses constatations, que les sphérules trouvent dans le mucus stomacal un milieu favorable à leur multiplication et qu'elles peuvent redonner les kystes dont elles dérivent.

Les sphérules persistent pendant longtemps à la surface de l'épithélium stomacal, ainsi que l'indiquent les observations suivantes :

Obs. XXIII, XXIV, XXV. — Trois Truites reçues de l'établissement infecté, en parfaite santé apparente, meurent un mois après, par suite de l'impureté de l'eau.

Deux sont infectées : des sphérules dans les fèces et dans le mucus stomacal.

Obs. XXVI. — Truite reçue de l'établissement infecté; sacrifiée 49 jours après, en parfaite santé apparente, avec fèces riches en sphérules.

Le mucus stomacal renferme de très nombreuses sphérules.

Obs. XXVII. — Truite reçue de l'établissement infecté; 45 jours après, j'observe dans les fèces de très nombreuses sphérules; le poisson est alors nécropsié. Le mucus stomacal renferme de très nombreuses sphérules; de très rares kystes dans la graisse interposée aux appendices pyloriques.

Obs. XXVIII. — Truite reçue de l'établissement infecté en parfaite santé apparente. Pour la première fois, des sphérules sont constatées dans les fèces 118 jours après la réception; meurt 4 jours après cette constatation par suite de l'impureté de l'eau. Des sphérules dans le tube digestif; très rares kystes intra-cœlomiques.

Obs. XXIX. — Truite reçue de l'établissement infecté; 4 jours après, je constate dans les fèces des sphérules qui persistent nombreuses pendant plus d'un mois; la santé générale est cependant très satisfaisante; une profonde plaie provoquée par une marque se cicatrise complètement; plus tard, les sphérules disparaissent des fèces, mais celles-ci peuvent occasionnellement renfermer des kystes toujours très rares. Le poisson meurt 92 jours après sa réception, par suite de l'impureté de l'eau.

Les divers organes, et plus spécialement la graisse interposée aux appendices pyloriques, renferment des granulations avec kystes; le mucus stomacal est farci de sphérules; celles-ci sont moins nombreuses dans l'intestin. La cavité cœlomique renferme quelques sphérules libres à 1 ou 2 noyaux; les kystes de faible dimension et à noyaux peu nombreux ne sont pas rares.

Il ressort de ces constatations que l'ichthyosporidiose a une évolution relativement lente et qu'un degré assez accusé d'infection est compatible avec les signes extérieurs d'un bon état général.

Il restait, enfin, à rechercher ce que deviennent les sphérules abandonnées dans l'eau. Dans ce but, des fèces de Truites infectées sont conservées dans des nouets en tarlatane, soit dans l'eau même des aquariums, soit dans des vases spéciaux, et examinées de jour en jour.

Dans ces conditions, on constate qu'après un laps de temps variable avec la température, les sphérules présentent des modifications importantes; en un point de la surface, le cytoplasma forme une saillie qui s'accroît rapidement et finit par former un prolongement d'aspect mycélien, susceptible de se ramifier (fig. 9). Malheureusement, je n'ai pas pu suivre le développement au delà de ce stade.

III

ANATOMIE PATHOLOGIQUE

L'ichthyosporidiose se traduit par des lésions qui envahissent la plupart des tissus, à l'exclusion toutefois de la musculature du corps, du squelette, des branchies et de la peau.

Les altérations consistent en un semis de granulations blanches (fig. 2), irrégulièrement arrondies, disséminées ou confluentes au point de former des nodules du volume d'un grain de chènevis; au niveau du foie, notamment, elles peuvent être assez abondantes pour se substituer presque complètement au tissu normal propre de l'organe. Celui-ci affecte alors l'aspect d'une masse boursouflée, blanchâtre, dont le volume peut être le décuple des dimensions normales.

1° TUBE DIGESTIF.

En général, la cavité du tube digestif des Truites infectées renferme, avec une fréquence variable, des parasites libres à divers stades de développement; mais, dans ce paragraphe consacré à l'histologie pathologique, j'envisagerai uniquement le cas où les *Ichthyosporidium* siègent nettement dans l'épaisseur de la paroi.

Or, c'est là une condition qui paraît rarement réalisée chez les Truites dont les viscères présentent des granulations, alors même que les sphérules sont abondantes dans le mucus stomacal ou dans les fèces, ou encore simultanément dans ces deux produits. Je n'ai observé que très peu de Truites chez lesquelles les parois du tube digestif renfermaient des kystes; ceux-ci siégeaient au niveau de l'estomac, surtout dans l'épaisseur de la sous-muqueuse, où ils déterminaient une légère réaction inflammatoire.

Ce fait est assez singulier, attendu que la paroi du tube digestif représente la voie principale d'infection et que, chez le poisson en question, d'assez nombreux parasites existaient et dans le mucus stomacal et dans la graisse enveloppant l'estomac.

A ce propos, il faut encore noter la fréquence et l'abondance des granulations à la surface cœlomique de l'estomac, alors que les tuniques qui constituent ce dernier sont exemptes le plus souvent de parasites.

On est ainsi amené à se demander s'il ne s'agit pas là simplement de conditions spéciales dans le développement, et si la rareté des *Ichthyosporidium* dans l'épaisseur de la paroi digestive ne tient pas simplement à ce que les investigations n'ont pas été effectuées au moment opportun. C'est tout au moins ce que semble indiquer l'examen de quelques Perches : en effet, sur 5 poissons infectés, 3 ont montré une abondance exceptionnelle de parasites siégeant dans l'épaisseur de la paroi de l'estomac, des appendices pyloriques et de l'intestin ; on peut alors suivre d'étape en étape la migration de l'*Ichthyosporidium* vers les organes cœlomiques ; la voie de pénétration est représentée par le stroma conjonctif des villosités à l'intérieur duquel le parasite se développe de façon à figurer sur les coupes l'image d'une sorte de bilboquet ; de là, il pénètre dans la sous-muqueuse, dans la musculaire, puis sous la séreuse (fig. 12), qu'il effondre finalement pour pénétrer dans le cœlome ou encore dans les tissus adhérant au tube digestif.

Dans toute la longueur de ce dernier, la réaction provoquée par le parasite est extrêmement peu marquée ; le plus souvent même celui-ci est simplement entouré par quelques fibrilles conjonctives qu'il comprime en s'accroissant.

2° FOIE.

Au niveau du foie, l'infection débute par des kystes assez petits et assez espacés pour ne pas être visibles à l'œil nu ; dans ces conditions, les coupes permettent de déceler de très rares parasites dont la taille ne dépasse pas une quinzaine de μ et dont la voie de pénétration semble correspondre au trajet des fibres conjonctives.

Une fois parvenu dans le parenchyme hépatique, l'*Ichthyosporidium* provoque la formation d'une capsule formée de cellules conjonctives et de leucocytes, parmi lesquels on distingue parfois des cellules géantes de dimension moyenne, toujours assez rares.

Ainsi encapsulé, le parasite continue cependant à s'accroître et ne tarde pas à produire des kystes secondaires; la réaction tissulaire suit une marche parallèle; en même temps, les cellules hépatiques se nécrosent, leur noyau se vacuolise; bientôt elles disparaissent et sont remplacées progressivement par les parasites et le tissu de néoformation qui évolue rapidement vers la sclérose (fig. 4).

La destruction des cellules hépatiques peut être plus ou moins complète; dans certains cas, c'est en vain qu'on chercherait des traces des éléments de structure normaux; la masse représentant le foie s'est considérablement hypertrophiée, mais elle n'est plus constituée que par des parasites encerclés dans des capsules de tissu lamineux. Dans ce cas, les parasites sont de dimensions assez variables, et un certain nombre de kystes sont vides de leur contenu; quelques-uns, plus rares, sont pénétrés par des cellules conjonctives et des leucocytes qui s'y organisent en tissu.

3° TISSU ADIPEUX.

Le tissu adipeux, qui recouvre les organes de la cavité abdominale, et plus spécialement celui qui est interposé aux appendices pyloriques, représente un lieu d'élection pour les parasites (fig. 2, 3); en général, c'est là la localisation la plus riche. Comme dans les autres tissus, l'*Ichthyosporidium* y devient rapidement le centre de formation d'une granulation; d'abord purement cellulaire, celle-ci comprend ensuite des cellules géantes, puis des fibres conjonctives. La multiplication du parasite est rapide et aboutit ici encore à la constitution de très nombreux kystes secondaires (fig. 5). La répétition de ce processus aboutit à la formation de grosses granulations confluentes, qui hypertrophient le tissu et le hérissent de nodosités.

Enfin, au voisinage des kystes, mais non à leur proximité, on peut parfois observer de volumineux amas de cellules présentant les caractères des plasmazellen des mammifères; chez la seule truie où j'aie vu ces éléments, ceux-ci coexistaient avec un état assez avancé de différenciation scléreuse.

Je signalerai, enfin, que, dans le tissu interposé aux appendices pyloriques, les *Ichthyosporidium* parasitent le tissu adi-

peux, à l'exclusion presque complète des îlots pancréatiques qui y sont inclus.

4° CŒUR.

Le muscle cardiaque est souvent profondément altéré. Le siège d'élection du parasite est représenté ici encore par le tissu conjonctif, en l'espèce par le péricarde; mais, les *Ichthyosporidium* pénètrent également entre les fibres musculaires les plus profondes.

Sous l'influence du parasite, le péricarde s'infiltré de très nombreuses cellules conjonctives qui s'ordonnent concentriquement; en certains points, les éléments conjonctifs prennent un aspect épithélioïde et se groupent de façon à dessiner des figures assez comparables aux globes cornés de certains épithéliomas.

Dans son ensemble, le péricarde reproduit la structure d'un bourgeon charnu dont, naturellement, la constitution histologique varie avec le degré d'évolution. Au début, les cellules dominent; ultérieurement, la sclérose devient plus ou moins complète. Au cours de ces modifications, le péricarde se soude intimement au myocarde, qui se sclérose à son tour, et il devient impossible de tracer une ligne de démarcation entre les deux formations. D'ailleurs, en plein muscle cardiaque, on retrouve des parasites qui sont également le centre d'une prolifération conjonctive. Notons, enfin, un degré assez marqué de dégénérescence graisseuse au niveau d'un certain nombre de fibres musculaires.

5° RATE.

Chez quelques-uns des poissons examinés, la rate présente une proportion élevée de parasites; dans ce cas, la structure normale est très imparfaitement conservée: le parenchyme splénique, infiltré de sang, ne persiste qu'à l'état d'étroits îlots dans les espaces laissés libres par les parasites et les cellules de néoformation.

Dans certains cas, on observe des amas de cellules nécrosées entremêlées de masses granuleuses, présentant les caractères de l'hémoglobine altérée.

6° ORGANES DIVERS.

Les autres organes se sont toujours montrés pauvres ou même très pauvres en *Ichthyosporidium* ; c'est, notamment, le cas du cerveau chez les poissons que j'ai observés ; mais il n'en est pas toujours ainsi : chez les Truites étudiées par Hofer, l'encéphale était le siège d'élection, parfois même le siège exclusif des parasites. On s'explique ainsi que l'incoordination des mouvements ne soit pas constante.

Dans la description précédente, j'ai visé les cas les plus typiques, mais il est vraisemblable que les lésions peuvent varier dans une certaine limite, suivant diverses conditions difficiles à préciser.

Je n'ai eu l'occasion d'examiner que trois lots de cadavres de Truites provenant de l'établissement infecté : ces derniers ont été recueillis en juin 1910 (12), en juillet 1910 (18), enfin en décembre 1910 (33). Or, à chacun de ces envois, j'ai pu noter des modifications dans les lésions ; c'est ainsi que le premier lot présentait des altérations organiques d'une gravité exceptionnelle qui n'a plus été atteinte depuis : dans certains organes, le foie notamment, le parenchyme tout entier était détruit et le nombre des parasites assez considérable pour qu'il en résultât une hypertrophie notable. Plus tard, les lésions se sont progressivement atténuées et, même, les spécimens du troisième envoi n'offraient plus que des lésions relativement discrètes.

En résumé, l'action du parasite sur les tissus de la Truite peut se schématiser de la façon suivante : l'*Ichthyosporidium* détermine une réaction qui aboutit à la formation d'une granulation (granulome de Plehn et Mulsow), formée d'éléments conjonctivo-vasculaires et, accessoirement, de cellules géantes. D'abord uniquement cellulaire, celle-ci se sclérose progressivement ; lorsque les *Ichthyosporidium* sont très nombreux, ce processus aboutit à la suppression physiologique de l'organe, bien que la forme générale soit conservée dans ses grandes lignes, même lorsque la présence des parasites a provoqué une hypertrophie marquée.

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS

Sous le nom de *Taumelkrankheit*, B. Hofer a fait connaître une maladie parasitaire affectant surtout les Truites de viviers (*S. irideus* et *S. fontinalis*); cette dernière doit son nom à ce que les poissons observés par le savant allemand avaient perdu la faculté de coordonner leurs mouvements.

Mais ce symptôme peut faire défaut; pour ma part, je ne l'ai jamais observé; aussi, me paraît-il plus conforme aux usages actuels de désigner cette affection sous l'appellation d'ichthyosporidiose, tirée du nom du microorganisme pathogène, l'*Ichthyosporidium*.

A la vérité, deux noms ont été déjà proposés pour désigner ce parasite. Le nom d'*Ichthyophonus* (meurtrier des Poissons), créé par M. Plehn et K. Mulsow, a bien l'avantage de rappeler le caractère pratiquement le plus important du parasite; toutefois, il n'est pas sans soulever quelques difficultés. En effet, antérieurement aux publications de A. Laveran et A. Pettit, de M. Plehn et de K. Mulsow, M. Robertson a décrit des parasites de la Truite de mer (Sea Trout) que je puis actuellement assimiler, génériquement tout au moins, à ceux qui ont provoqué l'épizootie que j'ai étudiée avec A. Laveran.

D'autre part, il ne peut y avoir de doutes sur l'identité du parasite signalé par B. Hofer et revu ensuite par A. Laveran et A. Pettit, puis par M. Plehn et K. Mulsow. Par conséquent, on a affaire à un seul parasite (génériquement tout au moins) que M. Robertson a rattaché, en 1909, au genre *Ichthyosporidium* de M. Caullery et F. Mesnil. Cette dernière appellation doit donc être adoptée jusqu'à plus ample informé.

Contre l'emploi de celle-ci, on ne pourrait en tout cas arguer qu'il s'agit d'une expression générique empruntée au règne animal. En créant l'ordre des Haplosporidies, M. Caullery et F. Mesnil ont nettement affirmé que les formes réunies sous ce vocable « ne sont pas sans affinités avec les Champignons inférieurs tels que les Myxomycètes et les Chytridinées... Avec les Chytridinées, nous trouvons en commun l'existence de masses plurinucléées où l'accroissement de volume du corps va de pair avec l'augmentation du nombre

des noyaux... ». Or, c'est là une conclusion que les présentes recherches confirment pleinement.

Peut-être est-il prudent, quant au nom spécifique, de s'en tenir à la réserve de M. Robertson, tant que l'évolution de ces parasites ne sera pas complètement élucidée. En effet, à l'heure actuelle, on ne peut décider si le parasite de la Truite de mer est spécifiquement distinct de celui de la Truite arc-en-ciel qui décime également la Truite indigène. Mais il y a plus : la réceptivité pour l'*Ichthyosporidium* n'est pas exclusive aux Salmonides ; ce dernier, en effet, peut provoquer des infections mortelles chez la Perche, la Tanche et la Carpe.

Toutefois, si on se conforme aux règles de la nomenclature, l'agent pathogène de cette épizootie deviendrait l'*Ichthyosporidium hoferi* (Plehn et Mulsow).

Actuellement, la nature de l'*Ichthyosporidium* ne peut plus faire de doute. Tout en notant ses affinités avec certains représentants de l'ordre des Haplosporidies, A. Laveran et A. Pettit inclinaient à considérer ce parasite comme un végétal. M. Plehn et K. Mulsow ont pleinement confirmé cette conception en obtenant, par ensemencement en bouillon, du mycélium, et ils concluent de leurs recherches que l'*Ichthyosporidium* doit prendre rang dans la classe des Phycomycètes, au voisinage des Chytridinées.

En faveur de la nature végétale de ce microorganisme, on doit faire valoir encore la forte teneur en graisse, la structure de l'enveloppe formée de cutine, enfin la présence, au sein du cytoplasma, d'un certain nombre de kystes, d'un réseau représentant toutes les apparences d'un capillitium.

Au cours de son développement, l'*Ichthyosporidium* affecte plusieurs aspects.

Dans les tissus de la Truite, il se présente surtout sous la forme de kystes globuleux, très riches en graisse, munis d'une enveloppe de cutine ; leur diamètre oscille entre 15 et 200 μ ; ceux-ci se rompent fréquemment et, par une ouverture de la capsule, tout ou partie du cytoplasma peut faire hernie au dehors et s'y ramifier.

Après fixation et coloration, le cytoplasma a une structure aréolaire ; il est parsemé de nombreux noyaux affectant deux

aspects; les uns (ce sont de beaucoup les plus nombreux) sont formés d'un petit karyosome arrondi compris dans une capsule acidophile (diamètre : 1,5-2 μ), dont un espace vide le sépare; les autres se réduisent à un grain, également basophile, mais plongé directement dans le cytoplasma.

Lorsque les kystes ont atteint un certain volume, ils peuvent se diviser en un certain nombre de kystes secondaires reproduisant, aux dimensions près, la structure des éléments dont ils dérivent. La multiplication s'effectue par division indirecte. Les karyokinèses déjà signalées par M. Caullery et F. Mesnil, puis par M. Robertson, se présentent dans les conditions habituelles aux Champignons inférieurs.

Un second aspect de l'*Ichthyosporidium* est représenté par des sphérules mesurant en moyenne 15 μ , munies d'une capsule et formées par un cytoplasma riche en graisse, renfermant un karyosome.

Ces sphérules s'observent surtout à la surface de la muqueuse digestive, plus spécialement dans le mucus qui constitue un milieu propre à leur multiplication; on les retrouve encore, mais beaucoup moins abondantes, dans l'épaisseur des parois du tube digestif ainsi que dans la cavité cœlomique et dans les divers parenchymes organiques. Dans la plupart des cas, les fèces des animaux infectés en renferment une proportion souvent élevée.

L'ichthyosporidiose se communique de Truite à Truite par injection intrapéritonéale de viscères riches en kystes, par ingestion de viscères riches en kystes, enfin par ingestion de fèces renfermant des sphérules.

Ce sont ces derniers éléments qui paraissent surtout chargés de propager l'infection; notons, à ce propos, que les kystes ingérés donnent rapidement des sphérules au niveau de l'estomac, dont le mucus constitue, on l'a vu, un milieu favorable à leur multiplication.

On retrouve les sphérules en question dans le fond des acini et entre les cellules épithéliales; bientôt après, on constate la présence, dans le stroma conjonctif de kystes, (1), en voie de

(1) Dans le mucus stomacal, quelques sphérules se transforment en kystes riches en karyokinèses.

multiplication, qui gagnent de proche en proche muqueuse, la musculature, enfin la séreuse qu'ils effondrent; ils tombent ainsi dans le cœlome et gagnent ensuite les divers viscères; ils peuvent encore cheminer dans l'épaisseur des replis appendus au tube digestif et gagner certains tissus, en particulier le tissu adipo-pancréatique.

Ajoutons que les sphérules évacuées avec les fèces sont capables de se développer dans l'eau ordinaire; dans ce milieu, au bout de trois à quatre jours, ces éléments présentent des modifications manifestes: la surface se hérisse d'un petit cône qui s'accroît assez rapidement et donne ensuite naissance à un filament, d'aspect mycélien, parfois ramifié, pouvant atteindre 5 à 6 fois la longueur primitive.

Cette évolution est à rapprocher de la très intéressante observation faite par M. Plehn et K. Mulsow, relativement à la production d'un mycélium par les kystesensemencés en bouillon.

Comme on l'a vu, les kystes représentent la forme de beaucoup la plus répandue au sein des tissus de la Truite. Dans l'épidémie étudiée par B. Hofer, l'encéphale était le siège d'élection, parfois même le siège exclusif des parasites; dans ce cas, l'expression de *Taumelkrankheit* est pleinement justifiée.

Chez les Truites que j'ai examinées, le tissu nerveux a toujours été très peu ou même pas parasité.

Ce sont, au contraire, les appendices pyloriques, le foie et le cœur qui ont offert le plus grand nombre de parasites. Les lésions consistent en un semis de granulations blanches, irrégulièrement arrondies, disséminées ou confluentes au point de former des nodules du volume d'un grain de chènevis; celles-ci comprennent, en outre des parasites qui les provoquent, des éléments conjonctivo-vasculaires abondants, dont certains affectent un aspect épithélioïde; parmi eux, on note quelques cellules géantes. Au bout d'un certain temps, le tissu de granulation passe au stade scléreux; finalement, un parenchyme donné, le foie notamment, peut être remplacé par une masse dépassant de 5 à 6 fois le volume normal et composée presque exclusivement de kystes, de tissu de sclérose et de cellules nécrosées.

A en juger, d'ailleurs, d'après le nombre de parasites qu'un poisson héberge au niveau des divers viscères, il n'est pas probable que l'*Ichthyosporidium* élabore une toxine active; la marche de la maladie est lente, les apparences d'un bon état général sont compatibles avec une infection très étendue, enfin un animal parasité peut guérir. En outre, chez les poissons ayant succombé à l'ichthyosporidiose, des parenchymes sont remplacés presque en totalité par les parasites et le tissu réactionnel, dont ils déterminent la formation, de telle sorte que la mort paraît être plutôt due à la suppression physiologique des organes qu'à une action toxique.

L'apparition des cellules géantes dans les granulations s'explique peut-être par l'action des graisses du cytoplasma; en effet, des recherches récentes, celles de J. Camus et Ph. Pagniez notamment, ont mis en évidence l'action élective des acides gras dans ce processus.

L'origine de l'épizootie reste obscure; l'eau d'alimentation des bassins ne présentait pas de parasites: l'hypothèse la plus plausible, c'est que le virus a été transmis aux Truites par l'intermédiaire des poissons de mer donnés en nourriture (1).

En l'absence de données sur l'étiologie, on ne saurait formuler de règles de prophylaxie. Cependant, dans l'établissement infecté, la maladie a été enrayée à la suite des mesures suivantes :

- 1° Suppression des sujets provenant des bacs contaminés;
- 2° Maintien des viviers dans un état de propreté rigoureuse;
- 3° Dérivation d'un caniveau collectant des eaux de pluie et du purin et se déversant antérieurement dans le lac qui alimentait les viviers;
- 4° Chaulage prolongé, pendant l'hiver 1910-1911, des viviers contaminés.

Je remercie M. Mesnil, pour divers renseignements qu'il a bien voulu me communiquer.

(1) Pour M. Plehn, l'origine du tournis des Salmonides doit être cherchée dans la nourriture que l'on fournit aux jeunes Truites et qui consiste en petits poissons de mer de la famille des Gadidés, souvent parasités par la *Lentospora*.

BIBLIOGRAPHIE

- CAULLERY (M.) et MESNIL (F.). — Recherches sur les Haplosporidies. *Archives de zoologie expérimentale*, IV, 3, 101-180, 3 pl., 1905.
- DÖFLEIN. — *Lehrbuch der Protozoenkunde*. Jéna, 1909.
- HOFER (B.). — Eine Salmonidenerkrankung. *Allgemeine Fischerei-Zeitung*, N.-F., VIII, 168-171, 1893.
- *Handbuch der Fischkrankheiten*. Stuttgart, 1904.
- LAVERAN (A.) et PETTIT (A.). — Sur une épizootie des Truites. *Comptes rendus des séances de l'Académie des Sciences*, CLI, 421-423, 1910.
- MULSOW (K.). — Die Taumelkrankheit der Salmoniden. *Allgemeine Fischerei-Zeitung*, XXXVI, 7, 146-148, 1911.
- PETTIT (A.). — A propos du microorganisme producteur de la Taumelkrankheit: *Ichthyosporidium* ou *Ichthyophonus*. *Comptes rendus des séances de la Société de Biologie*, LXX, 23, 1043-1047, 1911.
- PLEHN (M.) et MULSOW (K.). — Der Erreger der « Taumelkrankheit » der Salmoniden. *Centralblatt für Bakteriologie*, I Abth., Orig., LIX, 1, 63-68, 1 pl., 1911.
- ROBERTSON (M.). — Notes upon a Haplosporidian belonging to the Genus *Ichthyosporidium*. *Proceedings of the Royal Society of Edinburgh*, XVII, 5, 175-187, 2 pl., 1908.
- Notes on an *Ichthyosporidium* causing a fatal Disease in Sea-Trout. *Proceedings of the Zoological Society of London*, 399-402, 3 pl., 1909.

LÉGENDE DES PLANCHES XIII ET XIV

(A l'exclusion de la figure 10, toutes les figures sont relatives à la Truite.)

- FIG. 1. — Foie envahi par de nombreux kystes.
- FIG. 2. — Graisse interpylorique envahie par de nombreux kystes; début de réaction conjonctive.
- FIG. 3. — Granulation de la figure 2 dessinée à un plus fort grossissement. K, kyste, K₁, kyste en voie d'évacuation; K₂, kyste vide.
- FIG. 4. — Kyste en voie d'évacuation.
- FIG. 5. — Kystes secondaires.
- FIG. 6. — Kyste. Dans la partie inférieure, le cytoplasma a une structure réticulaire; dans la partie supérieure, il affecte un aspect compact.
- FIG. 7. — Kyste avec capillitium.
- FIG. 8. — Sphérules s dans le mucus stomacal; e, épithélium stomacal.
- FIG. 9. — Sphérules des fèces (en coupes colorées).
- FIG. 10. — Kystes chez le Crapaud. K, kystes secondaires; K₁, Kyste vide.
- FIG. 11. — Petits kystes développés dans l'estomac à la suite de l'ingestion de gros kystes.
- FIG. 12. — Coupe de la paroi stomacale. K, kyste faisant saillie dans le coelome.

LE BOUILLON A L'ŒUF

par A. BESREDKA et F. JUPILLE.

(Laboratoire de M. Metchnikoff.)

I

Au cours de nos recherches sur l'anaphylaxie au blanc d'œuf, nous avons été amenés à constater que le blanc d'œuf, dilué dans l'eau distillée et chauffé à 100 degrés, acquiert des propriétés nouvelles qui en font une substance différente du blanc d'œuf cru (1). L'idée nous est venue de l'utiliser comme milieu de culture et, pour en accroître les propriétés nutritives, de lui adjoindre le jaune d'œuf (2).

A la suite de longs tâtonnements, nous sommes arrivés à établir les proportions de l'un et de l'autre, nécessaires pour assurer au milieu le maximum de rendement et de transparence :

<i>Blanc d'œuf</i> (solution au dixième).	4 parties.
<i>Jaune d'œuf</i> (solution au dixième).	1 partie.
<i>Bouillon</i> ordinaire.	5 parties.

Le *blanc d'œuf* est battu avec dix volumes d'eau distillée que l'on ajoute par petites quantités. Le liquide devenu opalescent contient en suspension un grand nombre de petits flocons blancs. Pour s'en débarrasser, on passe le liquide sur un tamis recouvert d'une mince couche de coton hydrophile. On chauffe le liquide à 100 degrés pour activer la précipitation, puis on le filtre sur papier Chardin. Le liquide, d'un bel opalin, est réparti ensuite en ballons ou en tubes de 20 cent. cubes et stérilisé à 115 degrés pendant vingt minutes.

(1) *Annales de l'Institut Pasteur*, mai 1911.

(2) Voir *Comptes Rendus de l'Acad. Sciences*, t. CLVI, p. 1633.

Le *jaune d'œuf* est délayé dans dix volumes d'eau distillée, dans les mêmes conditions que le blanc. L'émulsion fortement opaque est additionnée de solution normale de soude, ce qui amène une clarification rapide du liquide. Un excès de soude étant préjudiciable aux qualités nutritives du jaune, il y a lieu de ne pas atteindre sa solubilisation complète : le jaune doit rester légèrement opaque, surtout en couche épaisse. Pour réaliser ce degré d'opacité, on ajoute, en général, à 400 cent. cubes d'émulsion de jaune d'œuf 1 cent. cube de solution de soude normale. Il faut cependant être prévenu que la quantité de soude à ajouter varie avec les œufs ; il y a des jaunes qui se laissent solubiliser par une quantité de soude deux fois plus faible que celle que nous venons d'indiquer. L'émulsion de jaune, ainsi clarifiée, est portée à 400 degrés, filtrée sur papier Chardin, répartie en ballons ou en tubes de 20 cent. cubes, puis stérilisée à 115 degrés pendant vingt minutes.

Le *bouillon* est préparé avec de la viande de bœuf ou de veau (500 à 750 grammes de viande hachée pour 1 litre d'eau) et la peptone Martin. La macération portée, à petit feu, à l'ébullition pendant une demi-heure, est filtrée, alcalinisée franchement, puis chauffée à 120 degrés pour activer la formation du précipité. Ce dernier étant ensuite retenu par du papier double, on répartit le bouillon en ballons ou en boîtes de Roux, et on le stérilise à 115 degrés pendant vingt-cinq minutes.

Pour préparer le bouillon à l'œuf, on verse dans un ballon renfermant 500 cent. cubes de bouillon stérilisé, d'abord 400 cent. cubes de blanc d'œuf stérilisé (solution au dixième), puis 100 cent. cubes de jaune d'œuf stérilisé (solution au dixième); on répartit ensuite le liquide dans des tubes stériles, à raison de 10 cent. cubes par tube.

Pour le bacille tuberculeux, on modifie un peu la composition du milieu : dans des boîtes de Roux renfermant 100 cent. cubes de bouillon stérilisé *non* peptoné, on verse, à froid, un mélange de 20 cent. cubes de blanc d'œuf (1 : 10) et de 5 à 20 cent. cubes de jaune d'œuf (1 : 10); nous allons y revenir.

Le bouillon à l'œuf placé dans l'obscurité et à la température

du laboratoire, conserve ses propriétés nutritives pendant des mois (1).

II

Nous avons essayé de cultiver dans ce milieu différents microbes, de préférence ceux dont la vitalité dans les milieux usuels est de courte durée : pneumocoques, méningocoques, gonocoques, streptocoques, ainsi que bacilles typhiques, paratyphiques, diphtériques, colibacilles, vibrions cholériques, bacilles tétaniques, tuberculeux, bactériidies charbonneuses, choléra des poules, microbes de la coqueluche et microbes chromogènes.

Le pneumocoque, le méningocoque, le gonocoque et bien souvent le streptocoque réclament, pour être entretenus dans de bonnes conditions, des soins particuliers : de plus, ce sont des microbes qu'il est bon de réensemencer tous les dix à trente jours, suivant l'espèce, si l'on ne veut pas courir le risque de les perdre.

Pour juger de la valeur du bouillon préparé avec du blanc et du jaune d'œuf, par comparaison avec d'autres milieux tels que bouillon ordinaire, bouillon-sérum, bouillon-ascite et gélose, nous avons ensemencé les microbes cités dans ces différents milieux, et une fois par semaine nous faisons des prélèvements pour nous assurer de la vitalité des cultures.

Sans entrer dans les détails de ces essais qui ont duré pendant des mois pour la plupart des microbes et pendant près de deux ans pour les streptocoques, ceux-ci nous ayant intéressés plus particulièrement, nous pouvons dire que, par comparaison avec les autres milieux, celui dans lequel sont incorporés le blanc et le jaune d'œuf s'est toujours montré le milieu dans lequel :

1° Les cultures sont beaucoup plus abondantes;

(1) Ce milieu est économique; un œuf de dimensions moyennes renferme 20 cent. cubes de jaune et 30 cent. cubes de blanc; dilué au dixième, un œuf dont le prix est de 10-15 centimes, fournit donc 500 cent. cubes de liquide. La même quantité de bouillon ordinaire nécessite une dépense d'au moins 1 fr. 25 centimes (viande : 75 centimes; peptone : 50 centimes).

2° Les microbes restent beaucoup plus longtemps en vie ;

3° La vitalité est plus facilement reconquise lorsqu'on part d'un microbe ayant poussé sur n'importe quel milieu, et dans des conditions peu favorables.

Le 21 mars 1911, on ensemence le pneumocoque dans du bouillon au blanc-jaune (c'est ainsi que nous désignons, pour abrégé, notre milieu) et on le laisse à l'étuve à 37 degrés jusqu'au 16 juin, c'est-à-dire pendant quatre-vingt-dix jours. Par suite de l'évaporation, la culture se trouve réduite à l'état de masse visqueuse de 1 à 1,5 centimètre de hauteur, de consistance de sang coagulé. L'ensemencement de ce coagulum dans du bouillon au blanc-jaune, ainsi que dans du bouillon ordinaire et sur gélose, a donné, quarante-huit heures après, une culture typique, très riche surtout dans le premier de ces milieux. Donc, le séjour à l'étuve pendant *trois mois* n'a pas compromis la vitalité du pneumocoque.

Le 19 avril, on ensemence le pneumocoque dans deux tubes de bouillon au blanc-jaune. Un de ces tubes est laissé à la température du *laboratoire*, l'autre est porté à la glacière.

Le 5 mai, c'est-à-dire seize jours plus tard, on réensemence les deux tubes en bouillon-ascite et en bouillon au blanc-jaune. Dans ce dernier seul on voit apparaître, le surlendemain, une culture abondante de pneumocoques ; les tubes de bouillon-ascite restent stériles.

Le pneumocoque, qui donne des cultures relativement discrètes dans les milieux ordinaires, change de caractère dans le bouillon au blanc-jaune : ses cultures sont d'une grande richesse, sa vitalité se conserve pendant des mois ; de plus, il est facilement ramené à vie après un séjour au laboratoire ou à la glacière.

Pour éviter les redites, disons que le *méningocoque* bénéficie dans notre milieu des mêmes avantages que le pneumocoque ; il en diffère seulement en ce qu'il a une vitalité plus restreinte : tandis que le pneumocoque reste vivant dans notre milieu, au moins pendant trois mois, le méningocoque n'a pas pu être maintenu en vie au delà de cinquante à soixante jours. Si l'on pense que, dans les milieux habituels, on est astreint aux réensemencements tous les huit jours, on saisira l'avantage qu'il y a de le conserver dans du bouillon au blanc-jaune.

Parmi les nombreux *streptocoques* que nous entretenons en vue de la préparation du sérum antistreptococcique, nous en possédons qui se montraient de tout temps particulièrement fragiles. Tandis que, en règle générale, les streptocoques

repoussent sans difficulté après un mois de séjour au laboratoire, nous en avons qui nous mettent souvent dans l'embarras lors des repiquages périodiques de la collection. Nos streptocoques sont cultivés depuis des années (1) dans un mélange de parties égales de bouillon et de sérum de cheval. Pour la grande majorité des streptocoques, ce bouillon-sérum doit être considéré comme le milieu de choix; mais il y a des streptocoques — nous en avons deux sur trente-trois — qui déjà après un mois donnent péniblement une culture et quelquefois n'en donnent pas.

Le 18 mars 1911, on ensemence les streptocoques « A » et « Fr », en bouillon-sérum. Le 26 avril, c'est-à-dire trente-huit jours après, on essaie de les repiquer dans du bouillon-sérum, mais sans succès; il est probable que les streptocoques étaient déjà morts depuis quelques jours. Or, les mêmes streptocoques, conservés dans du bouillon au blanc-jaune ont donné, repiqués quarante-huit jours après, des cultures abondantes dès le lendemain.

Le 14 octobre 1911, on ensemence des streptocoques d'origines variées dans du bouillon au blanc-jaune. Sept mois après (24 mai 1912), on les repique avec succès. Un an après (21 octobre 1912), par suite de l'évaporation, il ne reste au fond des tubes que de petits culots plus ou moins desséchés ou de consistance sirupeuse. On y ajoute 10 cent. cubes de bouillon au blanc-jaune, puis, après vingt-quatre heures d'étuve, on les remet au laboratoire jusqu'au 30 mai 1913. Sur huit tubes ainsi traités, 5 ont donné, réensemencés sur gélose, des cultures typiques.

Nous voyons donc que, d'une part, les streptocoques fragiles se conservent bien dans du bouillon au blanc-jaune et, d'autre part, les streptocoques ordinaires, au lieu d'être réensemencés tous les mois, restent vivants dans ce milieu au moins pendant vingt mois, et il est probable qu'ils continueraient à y vivre pendant plus longtemps.

Le *gonocoque* ensemencé en tube dans du bouillon au blanc-jaune et conservé pendant vingt-deux jours à l'étuve à 37 degrés, donne ensuite une culture abondante sur gélose-ascite. Ensemencé en boîte de Roux, le gonocoque donne une culture très riche dès le lendemain, sous forme de toile d'araignée donnant, à la moindre secousse, une émulsion tout à fait homogène.

D'autres microbes tels que les bacilles *typhique*, *paratyphique*, *coli*, le *Melitensis*, le vibrion *cholérique* forment un

(1) *Annales de l'Institut Pasteur*, 1904; p. 364.

riche dépôt de microbes, en moins de vingt-quatre heures. Lorsque, trois mois après, ces cultures réduites, par suite de l'évaporation, à 1-1 1/2 cent. cube de masse gélatineuse, ont été réensemencées en bouillon ordinaire, elles sont toutes reparties sans le moindre retard. Il est probable qu'il en eût été de même si nous avions attendu plus longtemps.

Nous avons également cultivé le bacille de la *diphthérie*, le *charbon*, le *choléra des poules*, ainsi que le bacille du *tétanos*, le *Perfringens* et un *protéolytique anaérobie*, isolé par M. Wollman de l'intestin de chien.

Ces trois derniers se sont mis à pousser dès le lendemain dans les conditions anaérobies. Ensemencés dans des conditions ordinaires c'est-à-dire *en présence de l'air*, ces trois anaérobies, et surtout le bacille du *tétanos*, ont donné des cultures au bout de deux à huit jours (1). Le *protéolytique* en question et le bacille du *tétanos* en se développant dans notre milieu, forment un coagulum plus ou moins volumineux et laissent au-dessus un liquide absolument transparent et incolore. Le bacille du *tétanos* cultivé dans des conditions aérobies, donne au bout de cinq jours une toxine aussi active, sinon plus active (2), que la toxine obtenue en conditions anaérobies dans du bouillon ordinaire.

Le *Prodigiosus* présente ceci de particulier, que non seulement il donne naissance à un dépôt microbien abondant, mais il confère au liquide surnageant une couleur rose qui est aussi belle que celle des microbes eux-mêmes.

Le microbe de la *coqueluche* de Bordet et Gengou, ensemencé *en boîte de Roux*, donne dès le lendemain une culture abondante d'un aspect moiré très net; le lendemain, tout le fond de la boîte est tapissé d'une mince pellicule ressemblant à une toile d'araignée, adhérente au verre. Les microbes continuant à pousser, on a vers le troisième jour une culture extrêmement abondante qui se présente sous la forme d'un dépôt muco-membraneux. Nous avons pu nous assurer que ce microbe si fragile reste vivant, en boîte de Roux, même après quatre mois de séjour à l'étuve.

(1) Certaines origines de *Perfringens* poussent difficilement d'emblée en présence d'oxygène.

(2) Un dix-millième de cent. cube de toxine donne le *tétanos* à la souris.

III

Le *bacille tuberculeux* est de tous les microbes celui que nous avons le plus étudié dans du bouillon au blanc-jaune. Au début de cette étude qui remonte à trois ans, nous ajoutions de la glycérine (5 p. 100), partant de cette notion courante que, en milieu liquide surtout, le bacille tuberculeux ne saurait s'en passer.

Quand on prend, pour ensemençer, un voile jeune de six à huit jours et quand on le pose doucement à la surface du bouillon en question, on voit dès le lendemain que le voile se trouve disloqué et qu'il pousse des prolongements dans tous les sens. Quatre ou cinq jours après, toute la surface du ballon est couverte d'une fine pellicule. Cette pellicule s'épaissit de jour en jour, pour atteindre, au bout de six semaines, une épaisseur inconnue dans du bouillon glycérimé ordinaire. Un peu plus tard, les bacilles entraînés par leur poids se décolent des parois du ballon, et le voile plonge au fond du liquide.

Sur pommes de terre baignant dans du bouillon au blanc-jaune glycérimé, la culture apparaît au bout de cinq à quinze jours et, en règle générale, plus tôt que dans les tubes témoins renfermant du bouillon glycérimé ordinaire. De plus, alors que dans ces derniers les bacilles poussent, au moins au début, seulement à la surface de la pomme de terre, on voit par contre, dans les premiers, la culture se faire en même temps dans le liquide qui baigne la pomme de terre.

En ajoutant des quantités variables de glycérine (1 à 5 p. 100) dans des ballons renfermant du bouillon (5 parties), du blanc d'œuf (4 parties) et du jaune d'œuf (1 partie), nous avons eu toujours des cultures surmontées d'un beau voile; mais, ce dernier était d'autant moins épais que le milieu renfermait moins de glycérine. Avec 1 p. 100 de glycérine, nous obtenions un voile très fin; mais comme il y avait en même temps culture en profondeur, nous avons décidé de supprimer complètement la glycérine.

Edifiés ensuite par les expériences faites dans un autre ordre

d'idées(1) sur la toxicité des dérivés peptonés, nous avons décidé de supprimer la peptone. Nous n'en avons pas moins obtenu des cultures abondantes dans des boîtes de Roux.

Plus tard, en faisant varier les proportions du blanc et du jaune d'œuf, nous avons acquis la conviction que l'on pouvait supprimer le blanc d'œuf; la richesse des cultures n'en souffrait pour ainsi dire pas; seulement, le bouillon contenant le jaune d'œuf seul (20 p. 100 de solution au dixième) se troublait à l'étuve. Aussi préférons-nous aujourd'hui, chaque fois que cela peut se faire, ajouter au jaune une certaine quantité de blanc. Le milieu ainsi préparé est absolument transparent et reste tel indéfiniment. Dans les cas où l'on ajoute au bouillon peu de jaune (5 p. 100 de solution au dixième), le trouble étant imperceptible, on peut se passer de blanc.

Lorsqu'on ensemence dans ce milieu auquel il n'est ajouté *ni peptone, ni sel, ni glycérine*, des bacilles tuberculeux, on obtient, après vingt-quatre heures d'étuve, une culture poussant en profondeur, ne le cédant en rien, quant à l'abondance, à celle d'un microbe ordinaire, tel que le streptocoque. De jour en jour la culture devient plus abondante. Au bout de deux ou trois semaines, elle forme une membrane blanchâtre tapissant complètement le fond de la boîte de Roux. Quelques secousses imprimées à la boîte suffisent pour transformer cette membrane en une poussière d'une extrême finesse. Laissés au repos pendant quelques instants, les bacilles se réunissent à nouveau en amas de plus en plus gros, puis reprennent leur aspect membraneux.

Le bouillon au blanc-jaune offre l'avantage de conférer aux cultures de bacilles bovins un aspect particulier distinct de celui des bacilles d'origine humaine. Ces expériences n'ont porté jusqu'à présent que sur onze origines bovines et dix origines humaines(2), mais elles ont été toutes concordantes; tandis que les bacilles humains donnent, au bout de quatre à six semaines, de petites écailles plus ou moins sèches, se détachant facilement du verre, les bacilles bovins forment des

(1) *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, t. LXXI, p. 691.

(2) Nous les devons à l'obligeance de MM. Calmette, Eber, Kossel et Vallée, ainsi qu'à nos collègues de l'Institut Pasteur, MM. Burnet, Charpentier et E. Fernbach.

filaments glaireux, collant aux parois, de consistance muco-membraneuse.

Si âgées que soient nos cultures, elles n'exhalent jamais cette odeur bien connue que l'on croyait inhérente à la tuberculine sécrétée par les bacilles; même après un an de séjour à l'étuve, les cultures restent inodores.

Nos cultures renferment cependant une tuberculine et même très active; il suffit de chauffer une culture de trois ou quatre semaines à 45 degrés, de la débarrasser des corps microbiens, puis d'en injecter 1,5 à 2 cent. cubes dans le péritoine de cobayes tuberculeux, pour être certain de les tuer en moins de vingt-quatre heures.

Cette tuberculine possède la propriété de fixer spécifiquement l'alexine en présence du sérum des sujets tuberculeux. Comme on le verra dans un article (4), qui paraîtra très prochainement les cobayes inoculés avec des bacilles tuberculeux donnent, avec cette tuberculine, une réaction de fixation positive dès le quatrième jour de l'infection, alors qu'il n'existe encore aucune lésion macroscopique. De même, chez l'homme, cette tuberculine permet de reconnaître des lésions latentes ou à peine ébauchées, alors que les signes cliniques sont encore muets ou indécis.

En résumé, le bouillon additionné de blanc et de jaune d'œuf constitue un excellent milieu de culture pour tous les microbes que nous avons eu l'occasion d'éprouver : pneumocoque, méningocoque, streptocoque, gonocoque, bacille typhique, paratyphique, coli, *Melitensis*, vibron cholérique, bacille de la diphtérie, choléra des poules, tétanos, *Prodigiousus*, microbe de la coqueluche, bacille tuberculeux; tous ces microbes se développent dans le bouillon à l'œuf plus abondamment et conservent leur vitalité plus longtemps que dans leurs milieux usuels.

(4) En collaboration avec M. Manoukhine.

SUR L'EMPLOI DES VIRUS DE PASSAGE RÉGÉNÉRÉS DANS LE TRAITEMENT DE LA RAGE

par le professeur O. BUJWID.

(Cracovie — Pologne — Autriche.)

Vingt-cinq années se sont écoulées depuis la découverte de L. Pasteur. La méthode qui a permis de combattre la maladie jusqu'ici incurable est restée telle qu'elle a été décrite par notre illustre Maître, sans avoir été modifiée. Les virus de passage employés dans tous les Instituts proviennent tous du virus primitif de Pasteur.

Il faut se demander si le virus que nous inoculons toujours sous la dure-mère du lapin n'a pas subi des modifications profondes qui le rendent différent de ce qu'il était à son origine. Le virus qui agit toujours sur la substance cérébrale n'est-il pas devenu cytolytique, par exemple, pour la substance nerveuse cérébrale et spinale?

Quelques observations que j'ai faites pendant ces vingt-cinq années semblent prouver que les modifications subies par le virus sont assez profondes et qu'elles peuvent être considérées comme assez importantes en ce qui concerne ses effets thérapeutiques. L'expérience directe n'est pas facile à faire, mais la statistique du traitement donne des résultats assez intéressants.

Depuis 1886, pendant les six premières années qui suivirent la fondation de mon premier Institut antirabique à Varsovie, la mortalité des personnes traitées ne dépassait guère 0,2 à 0,3 p. 100.

En 1893, j'ai aménagé l'Institut antirabique de Cracovie. J'ai remarqué là que la mortalité avait augmenté. J'essayai alors d'apporter quelques modifications au traitement: j'employai même la méthode sérothérapique.

Mais ces tentatives ne furent pas couronnées de succès.

J'ajoute, de plus, que les cas de paralysie après traitement se sont multipliés surtout en 1907, 1908 et 1909.

J'ai eu l'idée de regarder si la virulence des moelles employées n'était pas très atténuée, par comparaison avec celle des moelles primitives.

En 1910, je fis de nouveaux passages sur lapins, en partant du virus de rues provenant de chiens de Cracovie. Après trente passages, j'obtins un virus fixe: je commençai à l'employer dans ma pratique vaccinale.

Voici les résultats de ces observations :

ANNÉES	PERSONNES traitées.	MORTALITÉ	P. 100
1893	4	50	0
1894	38	0	0
1895	104	2	2
1896	146	0	0
1897	160	4	3
1898	288	3	1
1899	320	3	1
1900	404	5	1,2
1901	647	2	0,3
1902	516	8	1,7
1903	556	4	0,9
1904	537	5	1
1905	799	4	0,5
1906	746	8	1
1907	765	7	1
1908	867	13	1,7
1909	846	6	0,8
1910	780	7	1
1911	796	3	0,4
1912	1.120	4	0,4
1913	600 (1)	2	2,3

On peut observer que pendant les trois dernières années la mortalité reste presque fixe (en comptant le nombre des personnes mortes pendant le cours du traitement). Je n'ai, de plus, remarqué aucun cas de paralysie pendant ces trois années.

Il est évident que dans les Instituts où l'on note une augmentation de la mortalité, il y a lieu d'essayer l'emploi des virus de passage régénérés.

(1) Jusqu'au 1^{er} mai 1913.

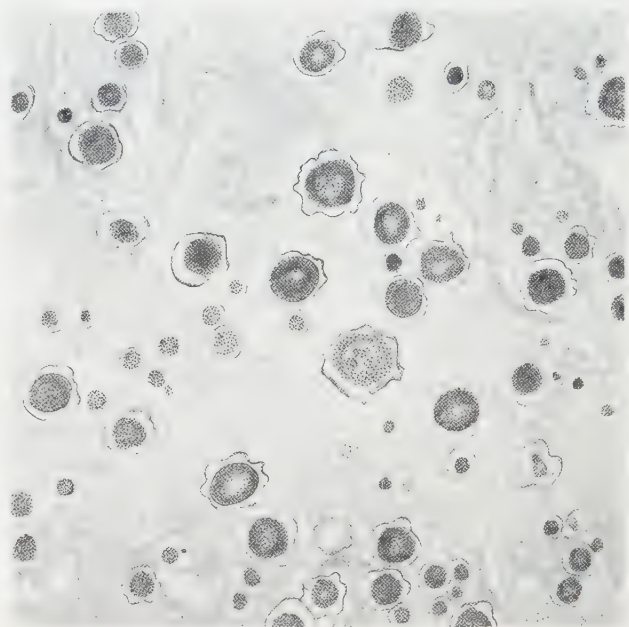
ERRATUM

Article de MM. J. BRIDRÉ et A. BOQUET. Sur 15 vaccinations contre la clavelée par virus sensibilisé :

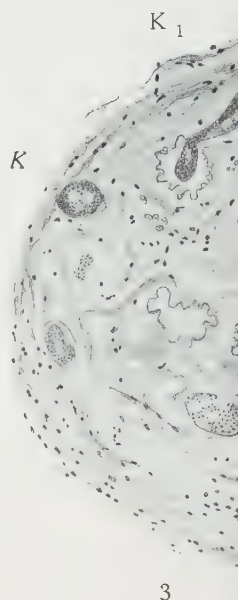
Page 826, ligne 13, *au lieu de* : injection, *lire* : infection.

Le Gérant : G. MASSON.

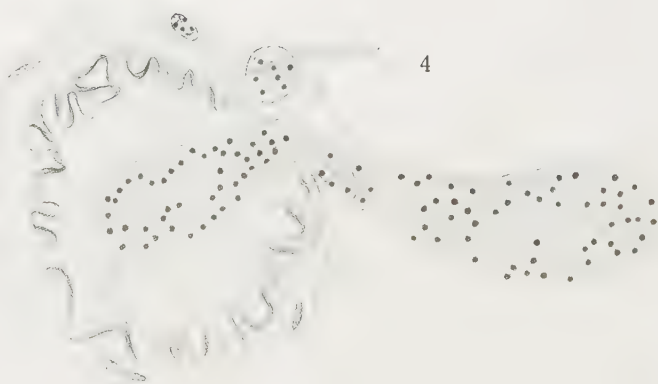
Paris. — L. MARETHEUX, imprimeur, 1, rue Cassette.



1

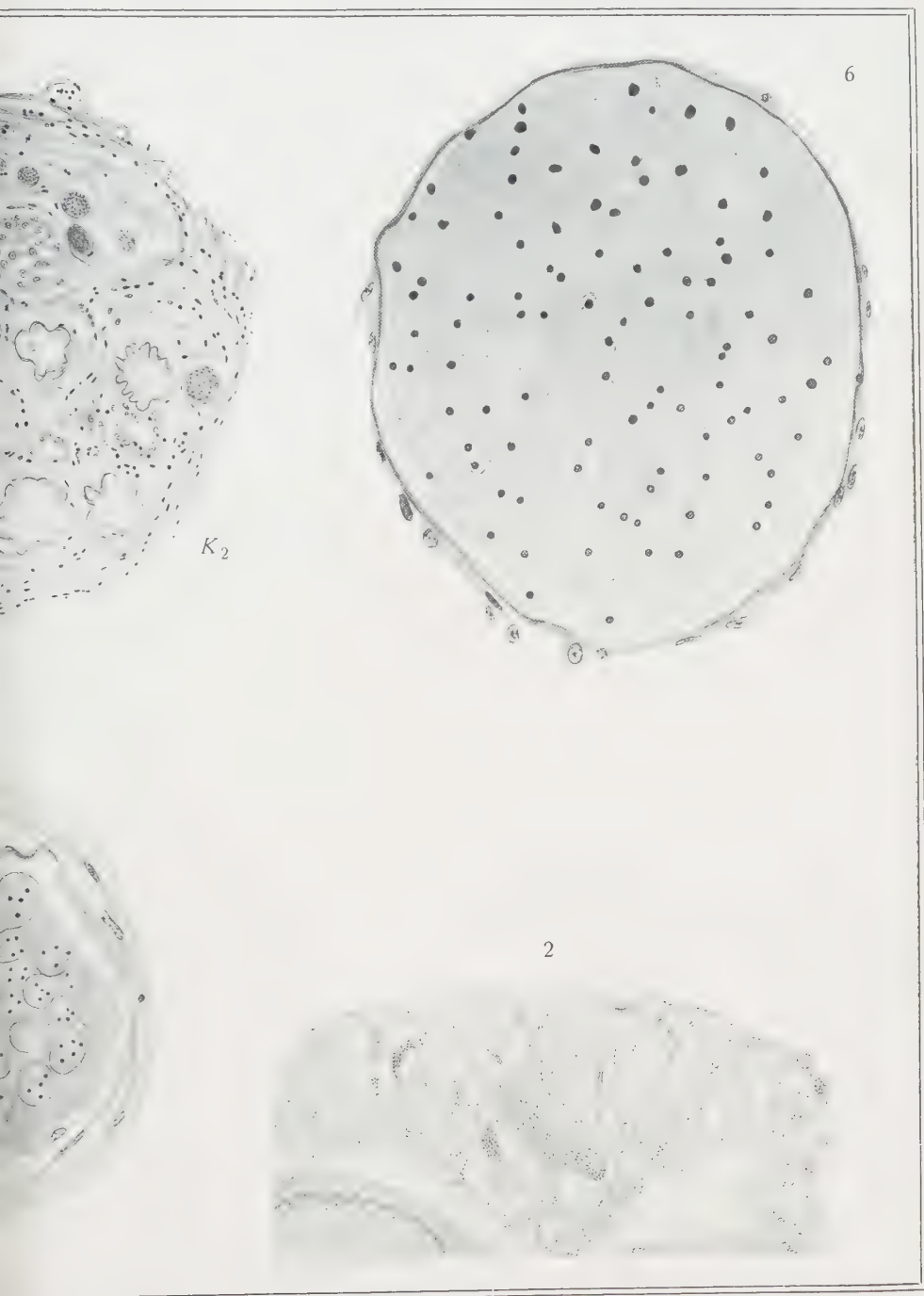


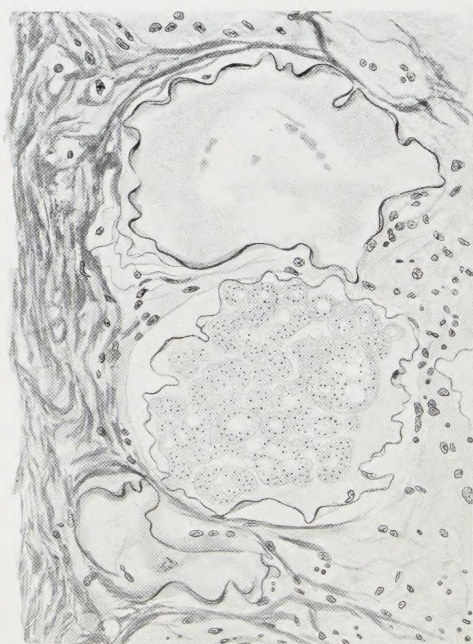
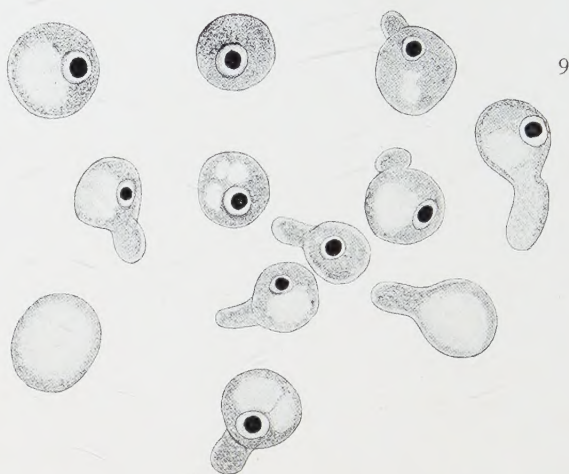
3



4

5



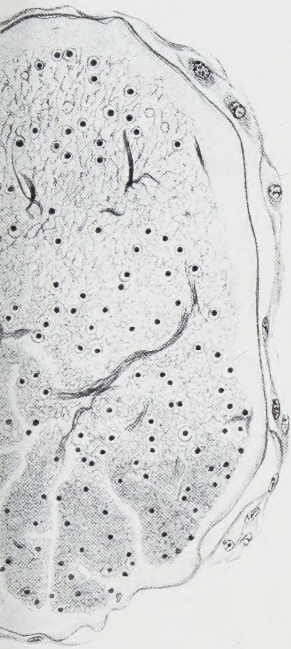


K'

K



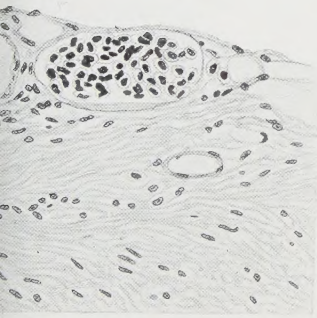
Constantin del.



7



8



11

